

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Vesna Sokol Karadjole

**Opravdanost primjene heparina male
molekulske mase u trudnica s
nasljednom trombofilijom kao uzrokom
opetovanih zadržanih pobačaja**

DISERTACIJA



Zagreb, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Vesna Sokol Karadjole

**Opravdanost primjene heparina male
molekulske mase u trudnica s
nasljednom trombofilijom kao uzrokom
opetovanih zadržanih pobačaja**

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

Disertacija je izrađena u Klinici za ženske bolesti i porode Kliničkog Bolničkog Centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada je prof. dr. sc. Marina Ivanišević iz Klinike za ženske bolesti i porođaje KBC-a Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc. Marini Ivanišević, kao i prof.emeritus Josipu Đelmišu na idejama, kreativnoj snazi i nesebičnoj pomoći koja me pratila tijekom doktorskog studija i ovog istraživanja. Hvala za svu podršku i savjete.

Zahvalna sam djelatnicima Odjela za Dijabetes i fetalni rast Zavoda za perinatalnu medicinu KBC-a Zagreb, bez čije pomoći tehnički dio rada ne bi bio moguć.

Veliko hvala doc.dr.sc. Milanu Miloševiću za pomoć pri statističkoj obradbi podataka, doktoru Mariu Vodanoviću za svu stručnu pomoć i savjete i doktorici Ramoni Relković za pomoć u prikupljanju podataka.

Posebna hvala mom suprugu Domagoju na strpljenju i velikoj podršci koju mi je pružao na svakom koraku tijekom izrade ovog rada.

Disertaciju posvećujem svojim roditeljima Lidiji i Ivanu koji su moja vječna inspiracija i koji su me naučili vrijednostima znanja, upornosti i rada.

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	HEMOSTAZA.....	1
1.1.1.	Formiranje trombocitnog čepa.....	1
1.1.2.	Koagulacijska kaskada.....	2
1.1.3.	Zaustavljanje zgrušavanja.....	5
1.1.4.	Eliminacija ugruška i fibrinoliza.....	7
1.2.	POREMEĆAJ HEMOSTAZE- TROMBOFILIJA.....	9
1.2.1.	Stečena trombofilija.....	9
1.2.2.	Nasljedna trombofilija.....	10
1.3.	NASLJEDNA TROMBOFILIJA I TRUDNOĆA.....	20
1.3.1.	Poremećaj implantacije posteljice i nasljedna trombofilija.....	22
1.3.2.	Preeklampsija, intrauterini zastoj rasta čeda, abrupcija posteljice, fetalna smrt i nasljedna trombofilija.....	22
1.3.3.	Pobačaj.....	23
1.4.	TERAPIJSKI PRISTUP TRUDNICAMA S NASLJEDNOM TROMBOFILIJOM.....	28
2.	HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	30
3.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	31
4.	ISPITANICE I METODE.....	31
4.1.	Ispitanice i način istraživanja.....	31
4.2.	Laboratorijske metode.....	35
4.2.1.	Genotipizacija faktora V Leiden, prothrombinskog gena, mutacije MTHFR te PAI-1 pomoću metode <i>real-time PCR</i>	36
4.2.2.	Deaktivacija aktivnosti proteina C.....	38
4.2.3.	Deaktivacija aktivnosti antitrombina.....	39
4.2.4.	Detekcija aktivnosti proteina S.....	39
4.3.	Statistička analiza.....	40
5.	REZULTATI.....	41
6.	RASPRAVA.....	60
7.	ZAKLJUČAK.....	76
8.	SAŽETAK.....	78
9.	SUMMARY.....	80
10.	LITERATURA.....	82
10.1.	Popis slikovnog materijala.....	99
11.	ŽIVOTOPIS.....	101

Popis korištenih kratica:

ACA	antikardiolipinska protutijela
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
ACCP	American College of Chest Physicians
AD	autosomno dominantno
ADP	adenozin difosfat
AFS	sindrom antifosfolipidnih protutijela
APC	aktivirani protein C
AT	antitrombin
ATP	adenozin trifosfata
aPTT	parcijalno tromboplastinsko vrijeme zgrušavanja
COX-1	ciklooksigenaza-1
COX-2	ciklooksigenaza- 2
CMV	citomegalovirus
CVI	cerebrovaskularni inzult
DIK	diseminirana intravaskularna koagulacija
DVT	duboka venska tromboza
EBV	Epstein- Barr virus
ELISA	(engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) enzimski vezan imunoapsorpcijski esej
EPCOT	Europska prospektivna kohortna studija na trombofilijama
EPCR	receptor proteina C
FVL	faktor V Leiden
GH	gestacijska hipertenzija
GPIa/IIa	integrinski glikoprotein Ia/IIa
GPVI	integrinski glikoprotein VI
HIV	virus humane imunodeficijencije
HIT	heparinom inducirana trombocitopenija
IM	infarkt miokarda
ITM	indeks tjelesne mase
IUGR	(eng. intrauterine growth restriction) intrauterini zastoj rasta
IVF	in vitro fertilizacija
KČS	kucajevi čedinjeg srca
LAC	lupus antikoagulant

MTHFR	metilentetrahidrofolat reduktaza
NFH	(eng. <i>UFH, unfractionated heparin</i>) nefrakcionirani heparin
NMH	(eng. <i>LMWH, low molecular weight heparin</i>) niskomolekularni heparin
NO	dušikov oksid
NSAID	(engl. <i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>) nesteroidni protuupalni lijekovi
PAI-1	inhibitor aktivacije plazminogena 1
PAI-2	inhibitor aktivacije plazminogena 2
PAR-1	proteaza- aktivirani receptor- 1
PAR-4	proteaza- aktivirani receptor- 4
PC	protein C
PDGF	(engl. <i>platelet-derived growth factor</i>) trombocitni faktor rasta
PE	preeklampsija
PGL1	prostaglandin 1
PGL2	prostaglandin 2
PGM	(eng. <i>prothrombin gene mutation</i>) mutacija protrombinskog gena
polyP	polifosfat
PS	protein S
PT	protrombinsko vrijeme zgrušavanja
RCOG	Royal College of Obstetrics and Gynaecologists
RES	retikuloendotelni sustav
TAFI	trombin aktivirani inhibitor fibrinolize
TE	tromboembolija
TF	tkivni faktor, tkivni tromboplastin
TFPI	inhibitor tkivnog faktora
TM	trombomodulin
tPA	tkivni aktivator plazminogena
TRC	trombociti
TT	trombinsko vrijeme
TxA2	tromboksan A2
UA	umbilikalna arterija
UV	umbilikalna vena
uPA	urokinaza
VWF	von Willebrandov faktor

1. UVOD

Značenje hemostatske ravnoteže prvi je opisao Astrup 50-tih godina prošlog stoljeća (1). U normalnom fiziološkom stanju hemostazu označava formiranje krvnog ugruška na mjestu ozljede krvne žile, a za nju je potrebno sinergično djelovanje žilnih, trombocitnih i plazmatskih čimbenika. Ovakav prirodni hemostatski sustav omogućuje brz i učinkovit odgovor ljudskog organizma na krvarenje.

1.1. HEMOSTAZA

Hemostazu karakteriziraju četiri faze koje započinju oštećenjem endotela, vazokonstrikcijom krvne žile uz formiranje trombocitnog čepa, koagulacijskom kaskadom, zaustavljanjem zgrušavanja te, naposljetku, fibrinolizom uz eliminaciju ugruška (2).

1.1.1. Formiranje trombocitnog čepa

Za stezanje manjih krvnih žila odgovorni su trombociti koji se aktiviraju ozljedom endotela i potom ispuštaju vazoaktivne tvari. Manje ozljede krvnih žila zatvaraju se trombocitnim čepom dok je za veće razdore potreban krvni ugrušak. Za prevenciju adherencije i aktivacije trombocita na neozlijeđen, intaktni endotel odgovorni su nitrini oksid i prostaciklin. Oštećenjem endotela blokira se stvaranje navedenih molekula, čime subendotelijalno tkivo dolazi u izravan kontakt s tvarima koje uzrokuju aktivaciju trombocita, kao što su mikrofibrili, laminin i kolagen te različiti proteini. Integrinski glikoproteini GPIa/IIa i GPVI, koji predstavljaju superobitelj adhezivnih proteina, dva su najvažnija trombocitno kolagenska receptora (3). U aktivaciji trombocita važnu ulogu ima i plazmatski protein trombin (4) koji aktivira trombocite vežući se na njihove proteaza-aktivirane receptore PAR-1 i PAR-4 čime započinje kaskadnu aktivaciju transmembranske signalizacije (5-9). Adenozin difosfat (ADP) sa svojim parakrinim/autokrinim svojstvima također sudjeluje u aktivaciji trombocita pojačavajući njihovu aktivnost vežući se za dva G-proteinska receptora, P2Y1 i P2Y12. Aktivacijom P2Y1 mijenja se oblik trombocita te dolazi do brze reverzibilne agregacije, a aktivacijom P2Y12 raste sekrecijska moć trombocita (10). Aktivacijom trombociti dobivaju sposobnost *adhezije, agregacije, sekrecije i prokoagulantne aktivnosti*.

Adhezivna sposobnost trombocita karakterizira se stvaranjem pseudopodija (lažnih nožica) trombocita, a nastaje spajanjem površinskog receptora glikoproteina (GP) Ib/IX/V s von Willebrandovim faktorom (VWF) u subendotelijalnom matriksu (11).

Agregacija trombocita karakterizira se „*inside-out*“ i „*outside-in*“ signalizacijom. Naime, aktivacijom trombocita dolazi do strukturnih promjena najgušće rasprostranjenih receptora na površini trombocita GP IIb/IIIa koji po svojoj strukturi pripadaju integrin superobitelji.

Strukturnim promjenama receptori dobivaju sposobnost vezanja za plazmatski fibrinogen i potom za vWF. Ovo se naziva „*inside-out*“ signalizacijom (12-14). Spajanje GP IIb/IIIa i vWF uzrokuje vezanje citoplazmatskog dijela aktiviranog GP IIb/IIIa kompleksa za citoskeleton trombocita, a posljedično dovodi do širenja trombocita i retrakcije ugruška, što se naziva „*outside-in*“ integrinskom signalizacijom. Navedene reakcije predstavljaju finalni zajednički put agregacije trombocita (15, 16).

Trombocitna sekrecija karakterizirana je sekrecijom aktivnih tvari iz granula trombocita. Trombociti sadrže dvije vrste granula: alpha granule i guste, tzv. „dense“ granule. Alpha granule otpuštaju fibrinogen, von Willebrandov faktor, trombospondin, trombocitni faktor rasta (PDGF, engl. *platelet-derived growth factor*), trombocitni faktor 4 i P' selektin, a guste granule otpuštaju ADP, ATP, ionizirajući kalcij, histamin i serotonin. Sve navedene tvari pridonose hemostazi. ADP i serotonin stimuliraju i regrutiraju dodatne trombocite (17). Serotonin je fiziološki odgovoran za vazodilataciju, dok u kontaktu s oštećenim endotelom može imati drukčiju funkciju i uzrokovati vazokonstrikciju. ADP aktivirani trombociti povećavaju ekspresiju unutarstanične adhezijske molekule (ICAM-1) na površini endotelne stanice (18). Trombospondin je adhezivni protein koji stabilizira trombocitni ugrušak. Fibrinogen se otpušta u kontaktu trombocita s ozlijeđenim endotelom (19). Tromboksan A2, metabolit arahidonske kiseline, uzrokuje vazokonstrikciju i učvršćivanje trombocitnog ugruška. PDGF, kao i ostali faktori rasta, djeluje potentno na glatke mišićne stanice te utječe na popravak oštećenog endotela.

Prokoagulacijsko svojstvo aktiviranih trombocita karakterizirano je prisutnošću brojnih prokoagulacijskih tvari na njihovoj površini, posebice fosfolipida fosfatidilserina i ostalih bjelancevina plazme koje sudjeluju u kaskadnoj reakciji procesa zgrušavanja (20).

U krvi i tkivima pronađeno je više od 50 tvari koje utječu na zgrušavanje krvi. Unatoč tome što u krvotoku normalno prevladavaju antikoagulacijska sredstva, cirkulacijska ravnoteža ovisi o savršenoj sinergiji prokoagulacijskih i antikoagulacijskih faktora. U slučaju oštećenja krvne žile aktivira se složena kaskada kemijskih reakcija s ciljem stvaranja kompleksa aktivnih tvari pod nazivom aktivator protrombina koji protrombin pretvara u trombin. Trombin djeluje kao enzim koji fibrinogen pretvara u topljiv fibrin, a aktivirani faktor XIII pretvara u fibrinski tromb. Nježne niti fibrina umrežuju trombocite, krvne stanice i plazmu formirajući ugrušak.

1.1.2. Koagulacijska kaskada

Zgrušavanje započinje koagulacijskom kaskadom, a završava stvaranjem aktivatora protrombina. Koagulacijska kaskada označava sekvencijsku pretvorbu inaktivnih oblika proteolitičkih enzima u aktivne oblike. Većina faktora koagulacije sintetizira se u jetri, osim

VWF-a koji nastaje u megakariocitima i stanicama endotela te faktora VII kojeg također produciraju endotelne stanice. Koagulacijska kaskada i stvaranje aktivatora protrombina mogu se prikazati na dva načina: vanjskim putem koji se aktivira oštećenjem stijenke krvne žile ili okolnih tkiva (*in-vitro* pretvorba izražena kao protrombinsko vrijeme zgrušavanja: PT) i unutarnjim koji započinje u samoj krvi (*in-vitro* pretvorba izražena kao aktivno parcijalno tromboplastinsko vrijeme zgrušavanja: aPTT). Vanjski i unutarnji put isprepliću se zajedničkom aktivacijom faktora X koji, kao dio protrombinaze, sudjeluje u pretvorbi protrombina u trombin. Trombin potom pretvara topljivi plazmatski protein fibrinogen u netopljivi fibrinski ugrušak (*in-vitro* pretvorba izražena kao trombinsko vrijeme: TT).

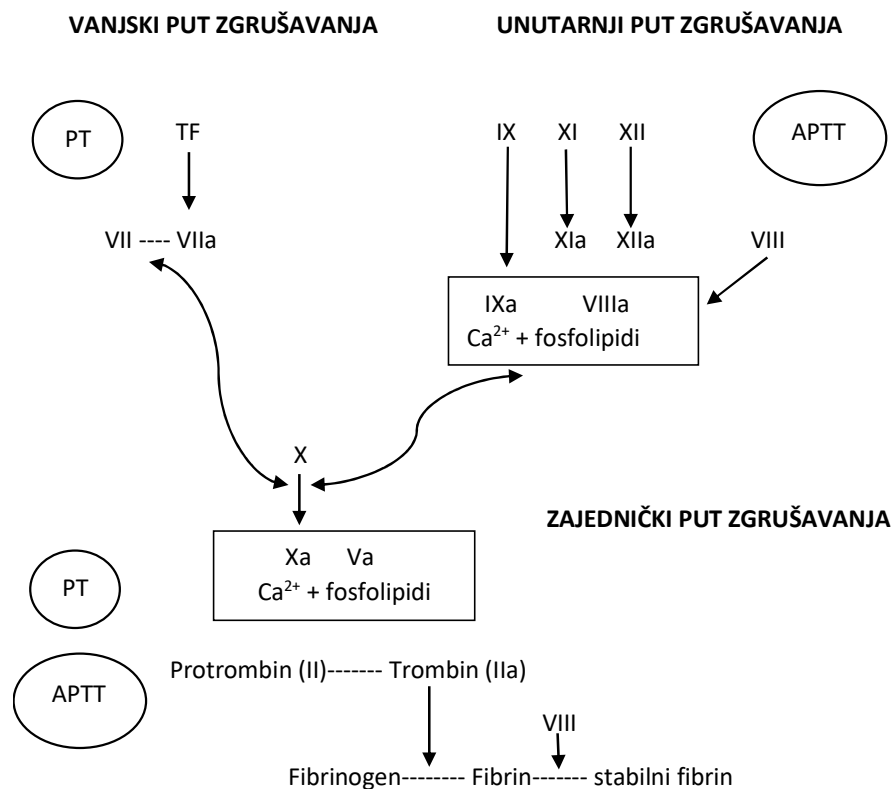
Vanjski mehanizam zgrušavanja krvi

Oštećenjem stijenke krvne žile dolazi do oslobađanja integralnog membranskog glikoproteina tkivnog faktora (TF, tkivni tromboplastin). Tkivni faktor u inaktivnom obliku uobičajeno nalazimo u tkivima kao što su koža ili vaskularna adventicija, dok ga u krvi te na površini endotela nalazimo samo u slučaju oštećenja krvne žile (21). U cilju pojačavanja koagulacijskog mehanizma trombociti također mogu sintetizirati svoj TF (22). Tkivni faktor služi kao kofaktor stvaranju aktivnog faktora VII (FVIIa) (23, 24). Kompleks tkivnog faktora i faktora VIIa u prisutnosti kalcijevih iona djeluje kao enzim na faktor X te nastaje aktivirani faktor X (Xa). Aktivirani faktor X odmah se spaja s faktorom V te s fosfolipidima koji su dio tkivnog faktora ili s fosfolipidima koje produciraju trombociti i tako nastaje kompleks nazvan aktivator protrombina. Aktivator protrombina uz prisutnost kalcijevih iona pretvara protrombin u trombin koji nastavlja proces zgrušavanja. Stvoreni trombin pojačava koagulaciju pretvarajući povratno inaktivni faktor V u aktivni oblik (FVa) koji potom dodatno ubrzava aktivaciju protrombina. Važno je naglasiti uloge sastavnih dijelova kompleksa aktivatora protrombina pri čemu aktivirani faktor X predstavlja proteazu kojom se protrombin pretvara u trombin; aktivirani faktor V ubrzava tu proteaznu aktivnost, a trombocitni fosfolipidi su posrednici kojima se dodatno ubrzava proces koagulacije.

Unutarnji mehanizam zgrušavanja krvi

Početna faza unutarnjeg mehanizma zgrušavanja uključuje nekoliko proteina plazme kao što su faktor XII (Hagemanov faktor), prekalikrein (Fletcherov faktor) i kininogen velike molekularne mase (HMWK, Fitzgelardov faktor) koji se aktiviraju nakon kontakta s negativno nabijenom površinom u traumatiziranoj stijenki krvne žile. Doticajem krvi s kolagenom ozljeđene stijenke krvne žile dolazi do strukturnih promjena trombocita i faktora XII. Aktivirani trombociti iz svojih granula otpuštaju fosfolipide koji sadrže lipoprotein nazvan trombocitni faktor 3, a faktor XII poprima novi molekularni oblik što ga pretvara u proteolitički enzim, aktivirani faktor XII. Aktivirani faktor XII, zajedno s kininogenom velike molekularne mase i prekalikreinom, aktivira faktor XI koji potom aktivira faktor IX. Aktivirani faktor IX, zajedno s aktiviranim faktorom VIII te s trombocitnim fosfolipidima i faktorom 3, aktivira faktor X.

Aktivirani faktor X zajedno s faktorom V i trombocitnim ili tkivnim fosfolipidima formira aktivator protrombina, a ova je reakcija istovjetna s posljednjim korakom vanjskog puta zgrušavanja. Aktivator protrombina potom pretvara protrombin u trombin i time se pokreće već opisani završni korak zgrušavanja (Slika 1.).



Slika 1. Vanjski i unutarnji mehanizam zgrušavanja krvi

Uz faktore koagulacije, važnu ulogu u unutarnjem putu zgrušavanja krvi imaju i polifosfati (polyP), molekule isprepletene visoko energetske mrežama. Polifosfat koji izlučuju trombociti iz gustih granula djeluje kao snažno prokoagulantno sredstvo (25). Sa svojim anionskim nabojem, polyP predstavlja negativno nabijenu površinu koja aktivira unutarnji put zgrušavanja. PolyP također ubrzava aktivaciju faktora V, inhibira aktivnost inhibitora tkivnog faktora (TFPI), pojačava polimerizaciju fibrina i zajedno s trombinom ubrzava aktivaciju faktora XI.

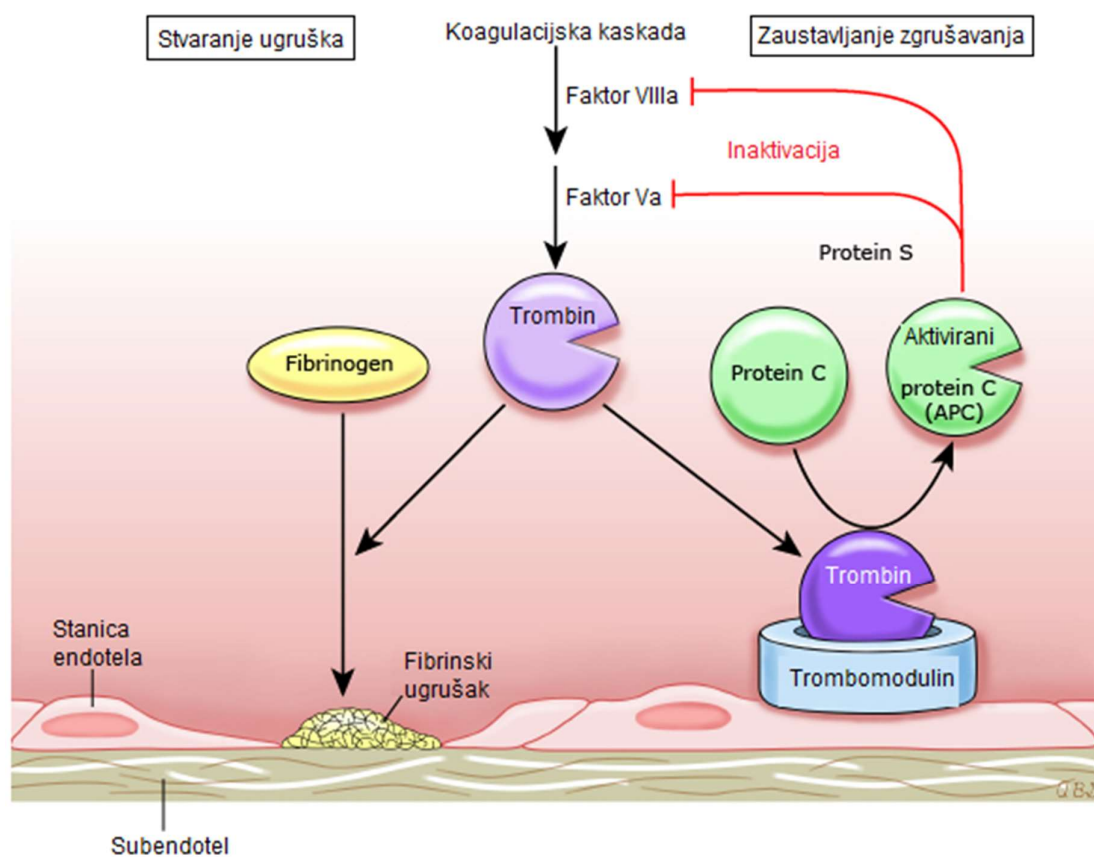
Vanjski i unutarnji put zgrušavanja aktiviraju se istovremeno oštećenjem stijenke krvne žile, a jedino se razlikuju u vremenu trajanja. Vanjski put je eksplozivniji i trajanje mu je ograničeno

potrošnim faktorima koagulacije X, VII i V te količinom faktora koja se otpušta iz ozlijeđenog tkiva, dok je unutarnji put mnogo sporiji.

1.1.3. Zaustavljanje zgrušavanja

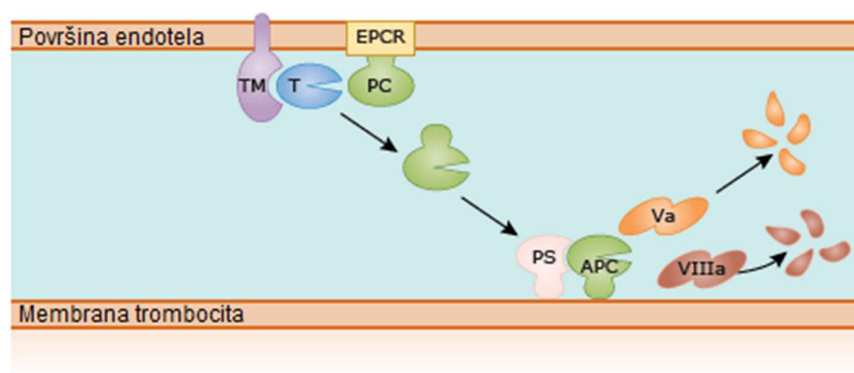
Kao i sve ostale reakcije u organizmu, hemostaza je kontrolirana brojnim enzimatskim procesima kojima se osigurava brz i lokaliziran odgovor na krvarenje, ali istovremeno i blokira pretjeran trombogeni odgovor i na taj način prevenira oštećenje tkiva. Kontrolni mehanizmi preveniraju trombozu smanjenjem koncentracije prokoagulacijskih tvari u krvotoku, uklanjanjem aktiviranih faktora koagulacije uz pomoć retikuloendotelnog sustava (RES) i aktivacijom prirodnih antikoaglacijskih puteva (26). Prirodni antikoaglacijski sustav je brojan i sadrži faktore poput antitrombina, proteina C, proteina S, inhibitora puta tkivnog faktora (TFPI) i dušikovog oksida (NO) čija je funkcija dominantna u završnoj fazi koagulacije. Antitrombin (AT) jedan je od najsnažnijih antikoagulanata u krvi koji neutralizira većinu enzima u koagulacijskoj kaskadi (faktor IIa, faktore Xa, IXa, XIIa i XIa) stvarajući s njima čvrste komplekse (27). Malu proteinsku molekulu antitrombina karakteriziraju dva aktivna vezna mjesta, reaktivni centar Arg393-Ser394 i heparin vezno mjesto. Vežući se na svoje vezno mjesto, heparin strukturno mijenja molekulu i time povećava aktivnost antitrombina 1000 do 4000 puta (27, 28).

Protein C (PC) predstavlja još jedan prirodni antikoagulans. U nastavku koagulacijske kaskade trombin se veže za trombomodulin (TM), integralni membranski protein na površini endotela (Slika 2.). Kontakt trombin-trombomodulin uzrokuje strukturne promjene molekule trombina, pri čemu on gubi svoja prokoagulacijska svojstva, a dobiva sposobnost aktivacije proteina C (Slika 3.) (29, 30). Aktivaciju PC s thrombin-trombomodulin kompleksom još više potiče EPCR, receptor proteina C koji se nalazi na stanicama endotela. Aktivirani protein C (APC), zajedno s još jednim antikoagulacijskim proteinom S, inaktivira faktore Va i VIIIa. APC prvo djeluje na poziciji Arg506 faktora Va, a potom na poziciji Arg306 i Arg679. Pozicija Arg506 esencijalna je za normalnu funkciju faktora V (31). Kod faktora V Leiden (FVL) aminokiselina arginin na poziciji 506 zamijenjena je s glutaminom i zbog toga protein C djeluje puno sporije na njegovu inaktivaciju (APC rezistencija). Kao posljedica toga, razvija se hiperkoagulabilnost. Uz PS, I faktor V također je kofaktor APC-a u inaktivaciji faktora Va i VIIIa, te je kod nositelja FVL-a i ta funkcija PC-a onemogućena što pogoršava postojeću hiperkoagulabilnost krvi.



Slika 2. Hemostatski kontrolni mehanizmi i završna faza zgrušavanja krvi.

Preuzeto i prilagođeno: Leung LLK, Overview of hemostasis, 2018.



Slika 3. Uloga proteina C i proteina S u terminaciji koagulacije.

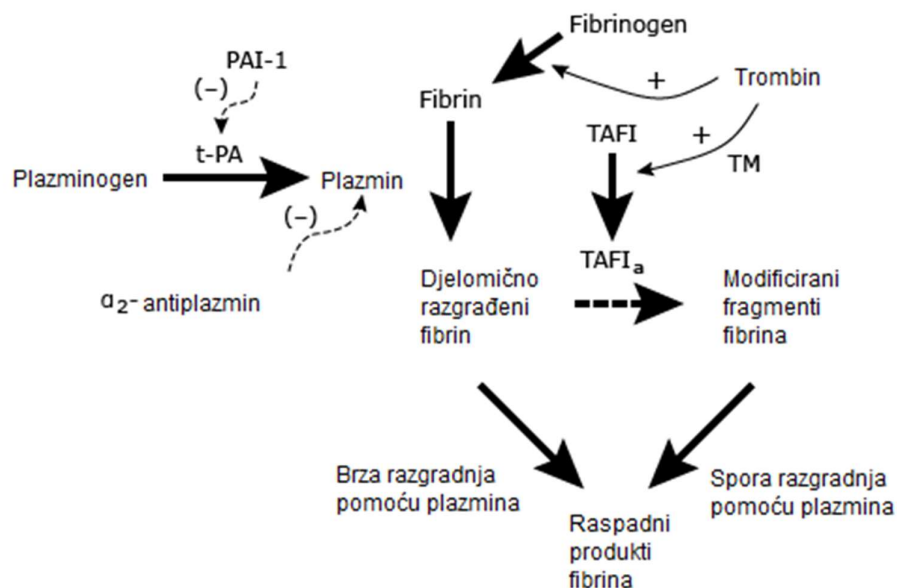
Preuzeto i prilagođeno: Bunn HF. Thrombotic Disorders. In: Pathophysiology of Blood Disorders, 2011.

Kofaktor PC-a, protein S, u krvotoku postoji u dva oblika: nevezan u aktivnom obliku te u inaktivnom kada je vezan u kompleksu s C4b komplementom. TFPI je još jedan antikoagulans koji se sintetizira u stanicama endotela (32). TFPI inhibira faktor X na dva načina; direktnom inhibicijom faktora Xa i u kompleksu TFPI-FXa - TF/FVIIa, čime regulira početni mehanizam vanjskog puta zgrušavanja (33, 34). U plazmi se može naći u slobodnom obliku (20%) kao TFPI- alpha i vezan za lipoprotein niske gustoće (LDL) (80%). Većina TFPI nalazi se na površini endotela vezana glikozaminoglikanima (TFPI- beta). Heparin stimulira naglu produkciju TFPI-ja u plazmi čime bi se mogao objasniti njegov jaki antitrombotički učinak te se danas rekombinantni TFPI proučava kao antikoagulacijsko sredstvo.

Tijekom koagulacije enzim fosfolipaza A2 djeluje na fosfolipide oštećenih stanica endotela oslobađajući arahidonsku kiselinu iz fosfolipida koju potom enzim ciklooksigenaza-1 (COX-1) na površini trombocita pretvara u tromboksan A2 (TxA2). TxA2 potiče agregaciju trombocita i vazokonstrikciju. Njegov oponent, druga aktivna supstanca, prostaciklin (Pgl2), kao važan produkt endotela, također nastaje iz arahidonske kiseline djelovanjem COX-1 ili COX-2 čiju produkciju inducira laminarni tok krvi u fiziološkim uvjetima (35, 36). Pgl2 blokira agregaciju trombocita te antagonizira vazokonstrikciju uzrokovanu tromboksanom A2. Stanice endotela produciraju još jedan potentni vazodilatator, dušikov oksid (NO). NO nastaje pod utjecajem agonista i fizikalnih stimulansa u raznim tkivima iz L-arginina katalitičkim djelovanjem NO-sintaze. Tako stvoreni NO važan je medijator homeostatskih procesa na koje utječe vazodilatacijom i sprečavanjem adhezije i agregacije trombocita (37).

1.1.4. Eliminacija ugruška i fibrinoliza

Uz formiranje ugruška, za urednu je hemostazu važna i njegova eliminacija. Odlaganje i otapanje fibrina moraju biti uravnoteženi kako bi se hemostatski čep održao i remodelirao u procesu popravka oštećene žile. Plazma sadrži euglobulin nazvan plazminogen koji veže fibrin i tkivni aktivator plazminogena (tPA). Ovaj trojni kompleks pretvara plazminogen u proteolitički enzim plazmin (38, 39). Plazmin ima širok spektar aktivnosti. On otapa fibrinske niti i inaktivira fibrinogen kao i druge faktore koagulacije: faktor V, VIII, protrombin i faktor XII (40). Cijepanjem polimeriziranog fibrina u krvotok oslobađaju se brojni topivi produkti njegove razgradnje (npr. D dimeri). Sustav plazminogen/tPA je uravnotežen i odvija se paralelno s koagulacijskom kaskadom (Slika 4.).



Slika 4. Regulacija fibrinolize inhibitorom aktivatora plazminogena 1 (PAI1), alfa 2 antiplazminom i trombin aktiviranim inhibitorom fibrinolize (TAFI).

Preuzeto i prilagođeno: Leung LLK, Overview of hemostasis, 2018.

Aktivnost plazmina balansirana je usklađenim djelovanjem aktivatora plazminogena i inhibitorima aktivacije plazminogena (PAI-1 i PAI-2). Dva su tipa aktivatora plazminogena: tkivni aktivator plazminogena (tPA) i urokinaza. Na sekreciju tPA iz endotelnih stanica utječu trombin, serotonin, bradikinin, citokini i epinefrin, a u plazmi cirkulira u kompleksu sa svojim prirodnim inhibitorom PAI-1 (40, 41). Drugi aktivator, urokinazu, luče epitelne stanice koje oblažu izvodne putove (npr. u bubregu ili dojci). Dok je tPA odgovoran za inicijaciju intravaskularne fibrinolize, urokinaza dominantno djeluje u ekstravaskularnom prostoru. Kao još jedan snažan aktivator plazminogena, spominje se i streptokinaza, bakterijski proizvod koji se ne nalazi normalno u tijelu.

Suprotno aktivatorima plazminogena, inhibitori blokiraju aktivnost tkivnog aktivatora plazminogena. PAI-1 sintetiziraju endotelne stanice i trombociti koji ujedno i reguliraju njihovo otpuštanje za vrijeme fibrinolize. PAI-2 sintetiziraju bijele krvne stanice i posteljica. Njegova funkcija inhibitora tPA je slaba i smatra se biološki nevažnom.

Inhibitor plazmina, alfa-2-antiplazmin, izlučuje se u jetri, ali nalazimo ga i u trombocitnim granulama (42). Aktivnost alfa-2-antiplazmina potaknuta je faktorom XIIIa koji veže alfa-2-antiplazmin u fibrinski ugrušak čineći tako ugrušak otporan na plazmin.

Trombin aktivirani inhibitor fibrinolize (TAFI) fiziološki je supstrat za kompleks trombin- TM. Aktivirani TAFI razgrađuje preostale djelove već raspadnutog fibrina i time onemogućava ugradnju fibrinskih niti u ugrušak i aktivaciju plazminogena. Kompleks trombin- TM aktivira

PC koji potiče koagulacijsku kaskadu, a aktivacijom TAFI-ja štiti već formirani ugrušak na mjestu oštećenja krvne žile od prijevremene razgradnje. Poremećaj normalne funkcije TAFI-ja ogleda se u brojnim stečenim i nasljednim poremećajima koagulacije (npr. hemofilija, kronične bolesti jetre). Kod osoba s mutacijom protrombinskog gena dolazi do pojačanog nakupljanja trombina te pojačane aktivnosti TAFI-ja, što posljedično dovodi do inhibicije fibrinolize i povećanja rizika za razvoj tromboembolijskih (TE) bolesti (43).

1.2. POREMEĆAJ HEMOSTAZE- TROMBOFILIJA

Kao što je već navedeno, za funkcionalnu hemostazu potreban je savršeno usklađeni dijalog tri faktora: žile, trombocita i proteina plazme. Promjene na bilo kojoj razini komunikacijskog lanca mogu dovesti do patoloških stanja različitih razmjera. Jedna od takvih promjena je trombofilija. Trombofiliju označava sklonost trombozi koja se, ovisno o mjestu nastanka, javlja u obliku arterijske i venske tromboze. Klinički važne venske tromboze manifestiraju se u obliku duboke venske tromboze (DVT), plućne embolije (PE), ponavljajuće venske tromboembolije (TE) i posttrombotskog sindroma. Trombofilija može biti nasljedna ili stečena.

1.2.1. Stečena trombofilija

Stečena trombofilija ili sindrom antifosfolipidnih protutijela (AFS) je autoimuni poremećaj karakteriziran stvaranjem antifosfolipidnih protutijela koja mogu uzrokovati arterijsku ili vensku trombozu, kao i patološke promjene u trudnoći poput spontanih pobačaja, fetalne smrti, prijevremenog porođaja ili preeklampsije (PE). Za dijagnozu AFS-a potreban je razvoj kliničke slike (u obliku tromboze ili patoloških stanja u trudnoći) te dva pozitivna testa u razmaku od tri mjeseca na lupus antikoagulant (LAC) ili anti- β 2-glikoprotein-I (44). U odnosu na kliničku sliku, razlikujemo primarni i sekundarni antifosfolipidni sindrom; primarni AFS je zaseban entitet, dok sekundarni oblik poremećaja često prati sistemski eritemski lupus i druge reumatske bolesti. Mehanizam nastanka tromboze i opstetričkih komplikacija nije u potpunosti istražen. Patogeneza AFS-a temelji se na stvaranju protutijela usmjerenih na jednu ili više tjelesnih bjelančevina koje se normalno vežu na fosfolipidne sastojke stanične membrane i štite od pretjeranih koagulacijskih poticaja. Autoprotutijela inhibiraju učinak tih zaštitnih proteina stvarajući prokoagulantnu površinu na endotelu. Protutijela se također vežu i za PC, annexin V, trombocite, serumske proteaze, tkivne faktore inhibirajući njihov antikoagulacijski učinak. Da bi još više pojačali prokoagulacijski učinak, antifosfolipidna protutijela djeluju i na vaskularni tonus uzrokujući vazokonstrikciju. Današnje studije podržavaju mišljenje da je kod pojednaca s pozitivnim antifosfolipidnom protutijelima potreban „*second hit*” tj. drugi udarac nakon koje će se bolest manifestirati s tipičnom kliničkom slikom (45). Drugi udarac ili provokator kliničke slike može biti pušenje, oralna hormonska kontracepcija ili hormonsko nadomjesno liječenje, dugotrajna imobilizacija,

malignitet, nefrotski sindrom, hipertenzija, hiperlipidemija i trudnoća ili babinje. Za perinatalni morbiditet u AFS-u odgovorna je tromboza koja primarno zahvaća posteljicu. Tromboza posteljice i decidue, infarkti i smanjenje ukupne mase posteljice često su opisivane promjene kod trudnica s AFS-om (46). Dijagnoza AFS-a u trudnoći temelji se na prisustvu najmanje jednog kliničkog i jednog laboratorijskog kriterija (47). Laboratorijski kriteriji uključuju prisutnost LAC-a ili antikardiolipinskih protutijela IgG-a ili IgM-a u serumu ili u plazmi srednjeg ili višeg titra ili anti beta2 glikoprotein-1 antitijela u serumu ili plazmi u dva određivanja u vremenskom razmaku od 12 tjedana mjerena standardnom ELISA metodom. Klinički kriteriji uključuju trombozu krvnih žila ili patološku trudnoću (jednu ili više neočekivanih smrti morfološki normalnog fetusa iznad 10 tjedana trudnoće, tešku PE/eklampsiju ili tri i više neobjašnjenih spontanih pobačaja prije 10 tjedana trudnoće). Diferencijalno dijagnostički potrebno je naglasiti da pozitivan titar na antikardiolipinska antitijela ne znači i AFS. Antikardiolipinska protutijela mogu se razviti i kao reakcija tijela na infekcije poput sifilisa, Lajmske bolesti, EBV-a, CMV-a, HIV-a i virusa hepatitisa C.

1.2.2. Nasljedna trombofilija

Nasljedna trombofilija predstavlja genetsku sklonost razvoju tromboze, a očituje se kao mutacija faktora V (faktor V Leiden- FVL), mutacija protrombinskog gena G20210A (PGM, faktor II), deficijencija proteina C (PC), deficijencija proteina S (PS) i deficijencija antitrombina (AT). Trombofilijom su obuhvaćene i dvije česte varijante gena, a to su mutacija enzima metilen tetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) i mutacija inhibitora aktivatora plazminogena 1 (PAI-1). U sklopu trombofilija većeg kliničkog značaja, FVL i PGM predstavljaju 50-60% svih nasljednih trombofilija. Poremećaji na razini PC, PS i AT-a nalaze se u značajno manjem postotku u populaciji.

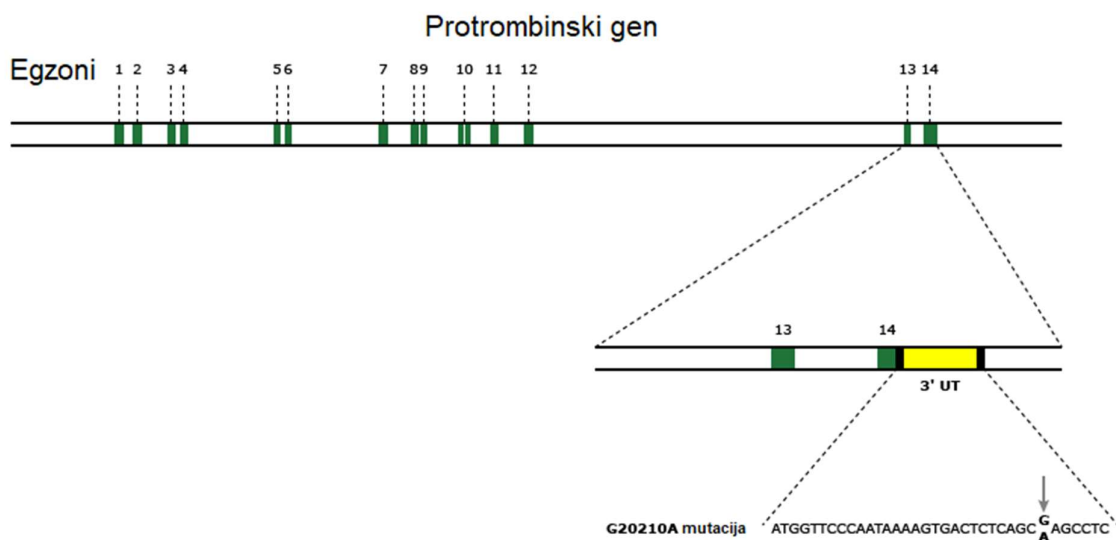
1.2.2.1. Faktor V Leiden (FVL)

Faktor V Leiden predstavlja mutirani oblik faktora V koji je otporan na aktivnost prirodnog antikoagulant proteina C (APC), čime njegovi nositelji razvijaju pojačan rizik za TE bolesti. Faktor V jedan je od faktora koagulacije kodiran genom F5 i njegovo prokoagulacijsko djelovanje očituje se utjecajem na produkciju trombina koji pretvara fibrinogen u fibrin. Trombin svojim povratnim mehanizmom pomaže pretvorbu inaktivnog faktora V u aktivni oblik (Va) koji potom postaje kofaktor kompleksu protrombinaze za produkciju trombina (pozitivna povratna sprega). Trombin također ograničava svoju produkciju (negativna povratna sprega) pretvaranjem PC u APC koji posljedično inaktivira faktor Va. Ova reakcija regulirana je PS kao kofaktorom.

Faktor V Leiden nastaje točkastom mutacijom gena F5 (eng. *single nucleotide polymorphism (SNP)*) pri čemu dolazi do zamjene nukleotidne baze gvanina u adenin što posljedično stvara aminokiselinu glutamin umjesto predviđenog arginina. Mutacija može nastati na poziciji 1691. ili 1746. nukleotida što također utječe na različite pozicije aminokiselina (506., odnosno, 534.). Mutacija onemogućava fiziološko djelovanje APC-a koji na fV djeluje ovisno o njegovom aktivitetu; inaktivira afV, a pojačava funkciju njegovog inaktivnog oblika. Kod osoba s FVL-om onemogućena su oba djelovanja APC-a (48, 49). FVL je autosomno dominantna (AD) mutacija i 99% svih nositelja su heterozigoti za mutaciju. Ostalih 1% su ili homozigoti ili pseudohomozigoti (kombinacija heterozigota za FVL i deficijencije faktora V) kod kojih je FVL jedini oblik faktora V u cirkulaciji (50, 51). Pseudohomozigoti su, kao i homozigoti, skloniji razvoju tromboze u odnosu na heterozigote. Heterozigoti će u malom broju slučajeva razviti TE, a za tako varijabilnu kliničku sliku uz postojeću mutaciju odgovorne su moguće supostojeće trombofilije ili druge varijante genske mutacije faktora V koje mogu uzrokovati APC rezistenciju, kao npr. faktor V Cambridge (zamjena Arg 306 s treoninom) (52), faktor V Nara (zamjena Trp1920 s argininom) (53), faktor V Liverpool (zamjena Ile35 s treoninom) (54, 55), faktor V Bonn (zamjena Ala512 s valinom) (56). Čak 40-50% bjelačke populacije nositelji su FVL-a i time ona predstavlja najčešći oblik trombofilije. Unatoč tome što je, u usporedbi s ostalim trombofilijama, najčešći uzročnik DVT-e, svega 5% heterozigota za FVL mutaciju razvije DVT tijekom života. Preostala većina ne razvija kliničku sliku te se mutacija najčešće otkriva slučajno genetskom analizom. Unatoč povišenom riziku za DVT, nema dokaza da heterozigotnost FVL-a utječe na sveukupni mortalitet (57, 58). FVL, uz prisutnost drugih rizičnih faktora, može utjecati na razvoj arterijske TE. Utjecaj mutacije na perinatalni morbiditet kao što je habitualni pobačaji tema je ovog istraživanja. Osobe kod kojih možemo posumnjati da su nositelji mutacije su: članovi obitelji s dokazanom trombofilijom, osobe s TE incidentom koji se dogodio ranije u životnoj dobi (<50 godine), osobe s DVT-om neuobičajene lokacije (portalna vena, cerebralna vena) ili osobe s ponavljajućim TE incidentima.

1.2.2.2. Protrombin G20210A mutacija (PGM, mutacija faktora II)

Protrombin G20210A mutacija predstavlja drugu najučestaliju mutaciju nakon FVL-a. Protrombin se sintetizira u jetri uz pomoć vitamina K i djeluje kao prekursor trombinu, završnom produktu koagulacijske kaskade, koji, kako je prethodno opisano, pretvara fibrinogen u fibrin. Kod protrombina G20210A mutacijom dolazi do zamjene nukleotidnih baza adenina (A) za gvanin (G) na poziciji 20210 nekodirajuće regije protrombinskog gena (59) (Slika 5.).



Slika 5. Mutacija protrombinskog gena.

Preuzeto i prilagođeno: Bauer KA, Prothrombin G20210A mutation, 2018.

Mutacija se nasljeđuje AD, a u najvećem se postotku javlja u heterozigotnom obliku (60). Mutacijom dolazi do promjene funkcije protrombina pri čemu se pojačava njegova aktivnost (61), što se očituje s čak 30% višom koncentracijom protrombina u plazmi kod heterozigota u odnosu na kontrolnu skupinu (59, 62), dok je kod homozigota ta koncentracija i dvostruko viša. Upravo je visoka koncentracija protrombina odgovorna za povišen rizik za razvoj tromboze kod nositelja mutacije. Nositelji G20210A mutacije predominantno su bijelci (prevalencija među bjelačkom populacijom oko 2%), a vrlo je rijetko možemo detektirati među ostalim rasama (63, 64). Klinička slika kod nositelja mutacije najčešće se očituje DVT-om. U studiji iz 1998., Margaglione i suradnici pokazali su da je od 281 pacijenta s DVT-om njih 8% bilo nositelj G20210A mutacije u odnosu na 850 osoba iz kontrolne skupine bez DVT-a kod kojih je utvrđeno 2% nositelja mutacije (OR za trombozu, 3.1; 95% CI 1.9-5.2) (65). Brojni su rizični faktori, kao npr. trudnoća ili oralna kontracepcija, koji kod nositelja mutacije mogu povećati rizik za razvoj DVT-e (66, 67). Trombozom su najčešće zahvaćene duboke vene donjih ekstremiteta (DVT) uz zahvaćanje plućne arterijske cirkulacije (plućna embolija, PE) ili bez nje. PGM ne smatra se statistički značajnim rizičnim faktorom za razvoj arterijske tromboze. Povezanost PGM-a s opsetričkim komplikacijama i dalje je kontradiktorna, a ovo je istraživanje analiziralo utjecaj ove mutacije na ponavljajuće pobačaje. Osobe kod kojih možemo posumnjati da su nositelji mutacije su: članovi obitelji s dokazanom trombofilijom, osobe s TE incidentom koji se dogodio ranije u životnoj dobi (<50 godine), osobe s DVT-om neuobičajene lokacije (portalna vena, cerebralna vena) ili osobe s

ponavljajućim TE incidentima. Rutinsko testiranje ne provodi se kod osoba s izoliranim DVT-om ili kod asimptomatskih članova obitelji.

1.2.2.3. Deficijencija proteina C

Protein C je protein plazme koji se sintetizira u jetri uz pomoć vitamina K. Vezanjem trombina za trombomodulin, specifični receptor endotela, dolazi do stvaranja serinske proteaze-aktivnog PC-a, čime PC dobiva svoja antikoagulacijska svojstva. APC inaktivira koagulacijske faktore Va i VIIIa koji su potrebni za generiranje trombina i aktivaciju faktora X (68). Za pojačanje funkcije APC-a potreban je protein S, još jedan antikoagulacijski faktor ovisan o vitaminu K. Uz antikoagulacijska svojstva, PC djeluje i u regulaciji upalnih procesa organizma. Vezujući se za endotelni receptor proteina C (EPCR) i proteaza-aktivirani receptor-1 (PAR1), APC izravno djeluje na stanice generirajući protuupalni medij otpuštanjem citoprotektivnih faktora (69). Razina PC-a postupno raste nakon rođenja i potrebno je određeno vrijeme da novorođenačka razina proteina u krvi (20-40% niža od razine odrasle osobe) dosegne razinu odrasle osobe (70, 71). Gen koji kodira protein C nalazi se na drugom kromosomu (2q13-14), a deficijencija se nasljeđuje AD putem (72, 73). Većina su nositelji heterozigoti za mutaciju, dok se homozigotni oblik deficijencija izrazito rijetko javlja u populaciji. Deficijencija predstavlja jedan od rjeđih oblika nasljedne trombofilije. Deficijenciju proteina C dijelimo na dva tipa s istom kliničkom slikom: tip I (kvantitativna promjena) koji karakterizira smanjena koncentracija i tip II (kvalitativna promjena) koji karakterizira smanjena funkcija PC-a. Tip I puno je učestaliji u odnosu na tip II. Deficit PC-a očituje se u 50% nižoj razini proteina u odnosu na normalnu razinu.

Prosječna koncentracija proteina C u plazmi iznosi 4mcg/mL. Osim mutacije, razina PC-a može biti snižena i kod drugih stanja koja utječu na sintezu PC-a kao što su akutne ili kronične bolesti jetre, upalne bolesti jetre, uremija, zloćudne bolesti, terapija antagonistima vitamina K (varfarin) ili diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK) (74, 75). Učestalost mutacije u zdravoj populaciji kreće se između 0,2-0,5% (71, 76), dok se u populaciji oboljelih od venske tromboembolije javlja između 2-5% (77-79). Klinička slika nositelja mutacije najčešće se manifestira trombozom. Najčešći je oblik venska tromboembolija (DVT, tromboza mezenteričkih vena, plućna embolija itd.). Teško je procijeniti ukupan rizik za razvoj tromboze i on ovisi o dodatnim rizičnim faktorima pojedinca, kao npr. pozitivna obiteljska anamneza na TE, dugotrajna imobilnost, uzimanje oralne hormonske kontracepcije, združena mutacija itd.

Iako vrlo rijetko, pojedini nositelji mutacije razvit će varfarinom induciranu nekrozu kože, komplikaciju nastalu liječenjem varfarinom. Varfarinom inducirana nekroza kože nije

specifična samo za deficijenciju proteina C, već se može manifestirati i kod drugih nasljednih trombofilija (80-82).

Neonatalna purpura fulminans javlja se kod homozigota za deficijenciju PC-a ili kod združenih heterozigota. To je rijetko vitalno ugrožavajuće stanje koje je obilježeno razvojem DIK-a, masivnom venskom i arterijskom trombozom te hemoragičnom nekrozom kože. Povezanost deficijencije PC-a s porođajnim komplikacijama kao što je intrauterina smrt fetusa i dalje je kontradiktorna (83), a njen se utjecaj na ponavljajuće pobačaje analizirao ovim istraživanjem.

Osobe kod kojih možemo posumnjati da su nositelji mutacije su: članovi obitelji s dokazanom trombofilijom, osobe s TE incidentom koji se dogodio ranije u životnoj dobi (<50 godine), osobe s DVT-om neuobičajene lokacije (portalna vena, cerebralna vena), osobe s ponavljajućim TE incidentima i osobe koje su razvile varfarinom induciranu nekrozu kože. Dijagnoza mutacije postavlja se laboratorijskim nalazom niske razine PC-a koja je prosječno 50% niža od normalne razine. S druge pak strane, apsolutni „normalni“ prag laboratorijskih vrijednosti nije jasan (84). Razina proteina u općoj populaciji vrlo je varijabilna i zbog toga je kod osoba s granično niskim razinama proteina teško postaviti dijagnozu deficijencije (85). Osobe s razinom ispod 55% vrlo su vjerojatno nositelji mutacije, dok se kod osoba s razinom između 55-65% može govoriti o deficijentnom stanju ili o najnižoj razini unutar normalne distribucije (71). Laboratoriji koriste različite metode detekcije razine PC. Za kvalitetnu analizu važno je isključiti akutne bolesti ili primjenu antikoagulacijskih lijekova (varfarin, heparin, inhibitor trombina, inhibitor faktora Xa) koji utječu na razinu proteina u kvi.

1.2.2.4. Deficijencija proteina S

Protein S je glikoprotein koji se, u ovisnosti o vitaminu K, sintetizira u hepatocitima, endotelnim stanicama i megakariocitima. PS funkcionira kao kofaktor APC-a u inaktivaciji prokoagulacijskih faktora Va i VIIIa, reducirajući time generiranje trombina i formiranje ugruška (86) (Slika 3.), ali i u fibrinolizi pri čemu izravno inhibira aktivaciju protrombina interakcijom s drugim koagulacijskim faktorima (87-89).

Deficijencijom PS-a onemogućeno je normalno uravnoteženo funkcioniranje koagulacijskog sustava i time se povećava rizik za trombozu. PS u plazmi cirkulira u dva oblika: 40% proteina cirkulira u slobodnom obliku, dok je 60% vezano za C4b sustav komplementa. Jedino slobodni oblik funkcionira kao kofaktor APC-a (90, 91). Ukupna razina PS-a mijenja se s dobi, dok je vrijednost slobodnog proteina S konstantna. Koncentracija PS-a u populaciji jako varira, čak više od koncentracije AT-a i PC-a. Ipak, prosječna vrijednost u plazmi odraslog čovjeka iznosi oko 23mcg/mL (92).

Deficijencija proteina S nastaje mutacijom PROS1 gena na kromosomu broj 3 a nasljeđuje se AD. Većina su nositelji mutacije heterozigoti, a samo se rijetko opisuju homozigoti ili složeni heterozigoti (93, 94).

Deficijencija PS-a dijeli se na tri tipa, ovisno o tome odnosi li se deficijencija na ukupni ili slobodni PS ili njegovu funkciju (95). Tip I predstavlja najčešći oblik deficijencije, a označava ga smanjena količina, kao i smanjena funkcija, ukupnog i slobodnog PS-a. Vrijednost ukupnog PS-a niža je 50%, a slobodnog PS-a 15% od normalne razine (96, 97). Tip I najčešće uzrokuju „*missense*“ ili „*nonsense*“ mutacije. Tip II deficijencija javlja se puno rjeđe u populaciji, a obilježava je smanjena funkcija uz urednu razinu ukupnog i slobodnog PS-a. Uzrok tipa II mutacije također su „*missense*“ mutacije. Tip III mutacije predstavlja defekt koji karakterizira normalna razina ukupnog proteina uz smanjenu količinu slobodnog proteina i smanjenu funkciju PS-a. Za sva su tri tipa deficijencije klinička slika i liječenje isti, stoga je diferencijacija potrebna samo u svrhe istraživanja.

Uz mutaciju PROS gena, protein S može bit snižen i u situacijama ko što su: trudnoća, uzimanje oralne hormonske kontracepcije, DIK, akutna TE, HIV infekcija, nefrotski sindrom i kronične ili akutne bolesti jetre. Teško je ustanoviti prevalenciju deficijencije PS-a s obzirom na velike varijacije koncentracije proteina u serumu u populaciji i uzimajući u obzir različite laboratorijske testove koji se koriste pri analizi.

Klinička slika nositelja mutacije manifestirat će se ovisno o tome imaju li pojedinci pozitivnu obiteljsku anamnezu na nasljednu trombofiliju i imaju li, uz nasljedne, i stečene rizične čimbenike za TE. Deficijencija PS-a rijetko se manifestira trombozom osim u slučaju pozitivne obiteljske anamneze. Ako se manifestira trombozom onda se najčešće razvije DVT ili PE. Kontrolna studija iz 2013. pod nazivom „*The Multiple Environmental and Genetic Assessment of Risk Factors for Venous Thrombosis (MEGA)*“ analizirala je pojavu DVT-a kod nositelja mutacije za deficijenciju PS-a ovisno o obiteljskoj anamnezi na nasljednu trombofiliju. Analizom je obuhvaćeno 4956 osoba s prvom epizodom DVT-a, dok je kontrolna skupina sadržavala 6297 zdravih pojedinaca. U zaključku se ističe da osobe s deficijencijom PS-a i negativnom obiteljskom anamnezom na nasljednu trombofiliju imaju puno niži rizik za razvoj DVT-a u odnosu na osobe s mutacijom i pozitivnom obiteljskom anamnezom. Također, studijom je istaknuto da deficijencija PS-a predstavlja nizak rizični čimbenik za razvoj DVT-a u odsustvu pozitivne obiteljske anamneze na nasljednu trombofiliju (98). Neonatalna purpura fulminans i varfarinom inducirana nekroza kože te komplikacije specifične za deficijenciju PS-a, iako sporadično, opisane su i kod nositelja mutacije za deficijenciju proteina S (99). Povezanost deficijencije PS s porođajnim komplikacijama kao što su habitualni pobačaji i dalje je kontradiktorna, a njihova se povezanost analizirala ovim istraživanjem.

Kao i kod drugih trombofilija, osobe kod kojih možemo posumnjati da su nositelji mutacije su: članovi obitelji s dokazanom trombofilijom, osobe s TE incidentom koji se dogodio ranije u životnoj dobi (<50 godine), osobe s DVT-om neuobičajene lokacije (portalna vena, cerebralna vena) i osobe s ponavljajućim TE incidentima.

Deficijencija PS-a predstavlja najveći dijagnostički izazov među svim nasljednim trombofilijama. S obzirom da je razina slobodnog PS-a u plazmi stabilna, upravo se ona koristi kao najsigurniji parametar za dokazivanje deficijencije (100, 101).

Za definitivnu dijagnozu deficijencije PS-a ne postoji idealan prag razine proteina u krvi. Dijagnoza će ovisiti o kliničkoj slici, o dobi osobe i o metodi koju pojedini laboratoriji primjenjuju. Za osobe koje su imale DVT ili imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu na DVT, dijagnoza se postavlja kada je razina proteina S između 60-65 IU/dL (102). Za osobe koje su zdrave (asimptomatske) ili koje su preboljele DVT ali bez pozitivne obiteljske anamneze, niže razine proteina S (<33 IU/dL) bolji su prediktor razvoja DVT-a (102). Prije postavljanja dijagnoze deficijencije PS-a, kao i prije izvođenja testova za dokazivanje deficijencije, bitno je otkloniti sve moguće uzroke koje će utjecati na smanjenje razine proteina u krvi kao što su: akutne i kronične bolesti jetre, akutna tromboza i primjena lijekova kao što su antagonisti vitamina K ili oralni antikoagulansi.

1.2.2.5. Deficijencija antitrombina

Antitrombin, prethodno zvan antitrombin III, jedan je od najvažnijih prirodnih inhibitora koagulacije krvi i kofaktor heparina. AT je po kemijskom sastavu aminokiselinski glikoprotein, serinska proteaza koja pripada porodici serpina, inhibitora serin proteaze. U koagulacijskoj kaskadi taj prirodni antikoagulant inhibira trombin, faktor Xa i druge serinske proteaze kao što su faktor IXa, XIa, XIIa i kalikrein (103). AT se stvara u jetri i kodiran je genom na prvom kromosomu. Njegova molekula sadrži dva funkcionalno važna područja. Prvo, na poziciji Arg393-Ser394 sadrži reaktivni centar koje osigurava mjesto cijepanja za proteinaze koagulacijskog sustava kao što je trombin, što je preduvjet za stvaranje stabilnog kompleksa proteinaza-inhibitor. Drugo funkcionalno područje je glikozaminoglikan spajajuće područje koje predstavlja heparin vezno mjesto. Vežući se za svoje vezno mjesto, heparin (nefrakcionirani ili niskomolekularni) strukturno mijenja molekulu AT-a pri čemu se pojačava aktivnost reaktivnog centra. Ove promjene pojačavaju antikoagulacijsku aktivnost AT-a za čak 1000 puta. Smatra se da stanice endotela sadrže endogeni heparan-sulfat koji u prirodnom miljeu pojačava aktivnost antitrombina održavajući normalnu fluidnost krvi (104). Njegovo antikoagulacijsko djelovanje također se očituje u smanjenju adhezije trombocita za fibrinogen. AT ima poluživot oko 2,8 do 4,8 dana, a u krvnoj je plazmi prisutan u dva oblika: kao aktivni monomer i kao inaktivna „latentna“ molekula (105). U fiziološkom smislu,

novorođenčad tijekom prvih šest mjeseci života ima 50% slabiju aktivnost antitrombina u odnosu na odraslu dob, nakon čega dolazi do postupnog rasta koncentracije AT-a u krvi (106, 107). Deficijencija antitrombina može biti nasljedna ili stečena. Stečena se deficijencija javlja češće i može nastati zbog poremećaja u proizvodnji AT-a (kod akutnih ili kroničnih bolesti jetre, uzimanja oralnih antikoagulanata, liječenja L-asparaginazom), zbog gubitka proteina (nefrotski sindrom) ili kao posljedica pojačane potrošnje (akutna tromboza, DIK). Manjak antitrombina može se razviti i kod uzimanja estrogena i oralnih kontraceptiva, a opisana je i deficijencija u trudnoćama kompliciranim gestacijskom hipertenzijom (GH), PE-om i eklampsijom. Nasljedna deficijencija prenosi se AD putem s varijabilnom penetracijom, a nastaje mutacijom SERPINC1 gena (108). Dva su tipa nasljedne deficijencije. Tip I predstavlja kvantitativnu deficijenciju (smanjena količina AT-a), a nastaje delecijom, insercijom ili zamjenom jedne baze gena. Tip I deficijencije javlja se u heterozigotnom obliku, dok je homozigotni oblik letalan i opisuje se samo kod miševa (104). Tip II predstavlja kvalitativnu deficijenciju i nastaje kao posljedica brojnih mutacija koje uzrokuju promijenjenu funkciju proteina. Prevalencija deficijencije AT-a je rijetka i u populaciji se kreće između 0,02-0,2% (108). Analizom krvi donora deficijencija AT-a prosječno se kretala između 0,2-0,6% (109-111). Ako će razviti kliničku sliku, deficijencija AT-a najčešće će se očitovati u obliku DVT-a, dok promjene koje zahvaćaju arterije nisu karakteristične za ovu patologiju (112). Brojne studije analizirale su povezanost deficijencije AT-a s razvojem DVT-a. Meta- analizom provedenom 2015., Di Minno i suradnici dokazali su da osobe s AT deficijencijom imaju 16,3 puta veći rizik za razvoj DVT-a u odnosu na kontrolnu skupinu i znatno veći rizik za DVT u odnosu na osobe s deficijencijom PS-a i PC-a (113). Ipak, važno je naglasiti da će velika većina nositelja mutacije, posebice oni koji su slučajno detektirani, biti asimptomatska. Osobe s AT deficijencijom posebice su izložene riziku tijekom trudnoće. U 2016. godini objavljena je meta- analiza četiri studije kojima se pratio razvoj DVT-a u trudnoći u ovisnosti o AT deficijenciji. U odnosu na kontrolnu skupinu, OR za DVT kod nositelja AT deficijencije iznosio je 6,1 (95% CI 1.6-23.4) (114). Conrad i suradnici 1990.-e potvrdili su zaključak prethodno navedene studije ističući značajniju povezanost AT deficijencije s razvojem DVT-a u odnosu na deficijenciju PC-a i PS-a (115). Ovo je istraživanje analiziralo utjecaj AT deficijencije na ostale patološke ishode u trudnoći kao što su habitualni pobačaji. S obzirom da je heparin indirektni inhibitor trombina i faktora Xa i za svoju funkciju zahtjeva primjerenu razinu cirkulirajućeg antitrombina, određeni broj nositelja mutacije može razviti heparinsku rezistenciju što će se manifestirati neučinkovitom antikoagulacijskom terapijom. S obzirom na nisku učestalosti AT deficijencije, testiranje razine antitrombina indicirano je samo kod osoba sa suspektnom nasljednom trombofilijom (pozitivna obiteljska anamneza na TE), kod pojave tromboze u ranijoj životnoj dobi i kod sumnje na heparinsku rezistenciju. Važno je naglasiti da ako se osobe testiraju zbog pojave tromboze, testiranje je potrebno

napraviti nakon akutnog stanja jer formiranje tromba obično snizi razinu antitrombina, čime se mogu dobiti lažno pozitivni rezultati. Isto vrijedi i za akutno upalno stanje te primjenu antikoagulacijske terapije.

1.2.2.6. MTHFR mutacija

MTHFR (metiltetrahidrofolat reduktaza) enzim jedan je od ključnih enzima u ljudskom organizmu. Sudjeluje u metaboličkim procesima za popravak DNA, ali i u procesima pretvorbe folata i folne kiseline u biološki aktivne spojeve nazvane L-metilfolatima (5-MTHF). Mutacija MTHFR gena relativno je česta pojava i zahvaća 5-7% populacije (116, 117). Postoje brojni polimorfizmi MTHFR gena, njih čak 30-ak. Ipak, klinički najvažniji i najčešće spominjani su C677T i A1298C. C677C predstavlja „normalnu“ poziciju alela i nukleotidnih baza MTHFR gena. Mutacijom, tj. polimorfizmom, dolazi do zamjene citozina u timin na nukleotidu 677. Mutacija uzrokuje da nositelji T alela proizvode manje efikasan, termolabilan MTHFR enzim. Nositelji mutacije mogu biti heterozigoti ili homozigoti. MTHFR (C677T) heterozigoti imaju jednu kopiju mutiranog alela MTHFR gena kojom se stvara MTHFR enzim 40% slabiji od normalne funkcije, dok MTHFR T677T homozigoti imaju mutirana oba alela što predstavlja teži oblik polimorfizma i 80% gubitka funkcije MTHFR enzima. Ako je osoba nositelj mutiranog alela na 677. i na 1298. poziciji, tada govorimo o složenim heterozigotima. Drugi po učestalosti oblik mutacije također se javlja u dva oblika. Dok A1298A predstavlja normalan MTHFR gen, mutacijom jednog alela nastaje MTHFR A1298C oblik koji uzrokuje 20%-no smanjenje funkcije MTHFR enzima i homozigotni C1298C oblik koji uzrokuje 40%-ni gubitak funkcije. Kao što je navedeno, MTHFR enzim uzrokuje stvaranje aktivnih folata 5-MTHF koji sudjeluju u metabolizmu aminokiseline homocisteina. Nedostatkom 5-MTHF, odnosno MTHFR mutacijom, dolazi do nakupljanja homocisteina u organizmu, tj. do hiperhomocisteinemije. Homocistein je fiziološki produkt koji nastaje pretvorbom metionina u cistein, a karakteriziraju ga aterogena i protrombotička svojstva. Histopatološki, u krvožilnom sustavu, homocistein uzrokuje zadebljanje vaskularne intime, oštećenje elastične lamine, zadebljanje glatkog mišića stijenke krvne žile, nakupljanje trombocita i formiranje okluzivnog tromba. Upravo zbog toga hiperhomocisteinemija predstavlja nezavisni rizični čimbenik za TE, te cerebrovaskularne, periferne vaskularne i kardiovaskularne bolesti. Isto tako, smatra se da visoka razina homocisteina može uzrokovati makularnu degeneraciju, Alzheimerovu bolest, gubitak sluha i karcinom. Iako velika većina studija upozorava na povezanost MTHFR mutacije s navedenim patologijama, smatra se da MTHFR mutacija ne predstavlja dovoljno jak nezavisni rizični čimbenik da bi se koristio u populacijskom probiru. Probir na hiperhomocisteinemiju je jednostavan, ali je korist od njegovog provođenja upitna s obzirom da nije dokazano da se spuštanjem razine homocisteina u krvi smanjuje rizik za

kardiovaskularne i TE bolesti. Normalna razina homocisteina kreće se između 5-15 µmol/L. Hiperhomocisteinemija se označava kao umjerena kada je razina homocisteina u krvi između 15-30 µmol/L, srednje teška s homocisteinom između 30-100 µmol/L i teška kada je homocistein >100 µmol/L (118).

Osim mutacije, hiperhomocisteinemija velikim dijelom može biti posljedica nedostatka folata ili vitamina B12 kod osoba s MTHFR mutacijom ili bez nje. Deficijencija folata može nastati zbog smanjenog unosa prehranom ili uslijed smanjenja apsorpcije. Poboljšanje prehrambenih navika uvođenjem folne kiseline, vitamina B12 i kolina (betaina) snizit će razinu homocisteina u krvi. S obzirom da niska razina folata može uzrokovati defekte neuralne cijevi tijekom razvoja ploda, unos folne kiseline posebice se preporuča trudnicama u prvom tromjesečju trudnoće.

Uz aterogeno i protrombotičko djelovanje, termolabilni MTHFR može uzrokovati i patološki perinatalni ishod poput PE-a, abrupcije posteljice, IUGR-a i fetalne smrti. Ipak, s obzirom na brojne kontroverze o uzročno posljedičnim vezama MTHFR mutacije i patološkog perinatalnog ishoda, probir na MTHFR polimorfizam u trudnoći obavlja se isključivo u sklopu cjelokupne obrade na nasljednu trombofiliju.

Liječenje se kod nositelja MTHFR mutacije temelji na snižavanju razine homocisteina ako je povišen. Terapija obuhvaća prehranu bogatu folnom kiselinom te vitaminima B12 i B6. Preporuka je da se umjesto folne kiseline uzimaju pripravci s aktivnim folatima u obliku 5-MTHF ili L- Metilfolata koji zaobilaze defektni MTHFR enzim i time bolje snižavaju razinu homocisteina u krvi.

1.2.2.7. PAI-1 mutacija

Isto kao mutacija MTHFR gena, i mutacija PAI-1 gena nema veći klinički značaj iako je njegova prevalencija u populaciji velika (oko 50%). Inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) je protein koji je kodiran genom SERPINE1 na sedmom kromosomu (7q21.3-q22). PAI-1 inhibira tkivni aktivator plazminogena (tPA) i urokinazu (uPA), dva faktora koja sudjeluju u procesu razgradnje ugruška. Inhibirajući tPA i uPA, PAI-1 blokira proces fibrinolize. Inhibitor plazimogena -2 (PAI-2) nastaje u posteljici tijekom trudnoće i nema značajniju kliničku važnost. Gen koji kodira PAI-1 ima nekoliko polimorfnih lokusa od kojih je najviše analiziran 4G/5G. Mutacija je posljedica delecije (4G) ili insercije (5G) jednog guanozina u promotorskom dijelu SERPINE1 gena. Oba alela mogu vezati transkripcijski aktivator, dok 5G veže represorski protein. Posljedično tome, homozigoti za 4G alele zadržavaju negativnu regulaciju koja rezultira s pojačanom transkripcijom PAI-1 gena uz pojačano stvaranje PAI-1 i veću sklonost trombozi u odnosu na heterozigote koji pokazuju srednje jak fenotip. 4G alel od 4G-5G polimorfizma odgovoran je za moguće patološke učinke PAI-1 mutacije. Iako je

vrijednost ovih genetskih varijanti trombofilije ponajprije prepoznata kao dodatni čimbenik uz već poznate čimbenike rizika, velik broj autora polimorfizam PAI-1 povezuje s patološkim stanjima kao što su venska TE, koronarna srčana bolest te metabolički sindrom, ali i s patološkim stanjima u trudnoći poput fetalne smrti, IUGR-a, PE-a i prijevremenog porođaja. Ipak, s obzirom na brojne kontroverze o uzročno posljedičnim vezama mutacije za PAI-1 i patološkog perinatalnog ishoda, probir na PAI-1 mutaciju u trudnoći obavlja se isključivo u sklopu cjelokupne obrade na nasljednu trombofiliju.

1.3. NASLJEDNA TROMBOFILIJA I TRUDNOĆA

Trudnoća predstavlja fiziološko stanje hiperkoagulabiliteta te su zbog toga osobe s nasljednom trombofilijom u trudnoći pod dodatnim rizikom za razvoj tromboze. Tijekom trudnoće i babinja hiperkoagulacija štiti tijelo olakšanim formiranjem ugruška u slučaju obilnog gubitka krvi ponajprije u trenutku odvajanja posteljice nakon porođaja. Hiperkoagulabilitet tijekom trudnoće nastaje zbog promjena u koagulacijskom i fibrinolitičkom sustavu. U trudnoći raste koncentracija faktora zgrušavanja (faktora II, VII, VIII, X, XII), kao i fibrinogena. Pojačano je stvaranje fibrina, a smanjena aktivnost fibrinolitičkog sustava, na što upućuje značajno povišena koncentracija inhibitora fibrinolize- TAFI-a, PAI-1 i PAI-2. Povišena je razina VWF-a. U drugom i trećem tromjesečju raste rezistencija na APC, a aktivnost PS-a i njegova ukupna razina u krvi blago se snižavaju. PC, kao i faktori V i IX, nalaze se unutar referentnih vrijednosti ili su tek naznačeno povećani. Svi navedeni testovi normaliziraju se u razdoblju od šest do osam tjedana nakon porođaja.

Trombofilija u trudnoći može biti uzrok različitih patoloških stanja. Posteljica je kompleksan privremeni organ koji nastaje sjedinjenjem tkiva majke (bazalna decidua) i tkiva zametka (embrijske ovojnice amniji i korion) u morfološku i funkcionalnu cjelinu koja služi izmjeni tvari između majke i fetusa u oba smjera. Placentna cirkulacija pod utjecajem je različitih faktora, a posebice majčinog krvnog tlaka, uterine aktivnosti, majčinih hormona i lijekova. Pred kraj trudnoće protok krvi kroz posteljicu iznosi 500ml/min, što predstavlja 80% protoka kroz uterus. Fetalnu stranu cirkulacije karakteriziraju vilozne kapilare, ogranci umbilikalne arterije. Fetalna krv pristiže u intervilozni prostor preko dvije umbilikalne arterije, a odlazi prema fetusu preko jedne umbilikalne vene. Razlike u tlakovima osiguravaju nesmetan protok kroz krvožilni sustav. U UA-u tlak iznosi 50mmHg i potom se, granajući se na manje krvne žile, u viloznim kapilarama spušta na 30mmHg, dok u UV-u iznosi samo 20mmHg. Tijekom trudnoće, protok krvi kroz uterus povećava se i prilagođava zahtjevima rastućeg embrija. Spiralne arterije, ogranci uterinih arterija u trudnoći, prolaze kroz proces transformacije kojim se lumen arterije širi i postaje manje elastičan omogućavajući veći protok krvi kroz uterus. Spiralnim arterijama, uz tlak od 70mmHg, majčina krv ulazi u intervilozni prostor u kojem je

tlak 10mmHg, a napušta ga uterinim venama rasprostranjenima na periferiji interviloznog prostora. Krv se u interviloznom prostoru izmjenjuje svake dvije do tri minute. Tromboza spiralnih arterija i interviloznog prostora smanjuje opskrbu majčine strane posteljice potrebnim količinama krvi i time usporava fiziološku prilagodbu tijela na trudnoću. Točnije, kod trudnica s trombofilijom disfunkcija endotelних stanica, aktivacija koagulacije, odlaganje fibrina i uteroplacentarna tromboza oslabit će invaziju trofoblasta u spiralne arterije i onemogućiti transformaciju spiralnih arterija što (pod zajedničkim nazivom placentarne insuficijencije) može dovesti do poremećaja implantacije, habitualnih pobačaja, PE-a, IUGR-a, abrupcije posteljice i fetalne smrti. Uz fetalnu patologiju, trombofilija može uzrokovati i TE majke.

Unatoč tome što je nasljedna trombofilija prisutna u svega 10% bjelačke populacije, smatra se da je ona odgovorna za oko polovicu TE-a bolesti majke. Trudnoća fiziološki povećava rizik za DVT zbog brojnih promjena kao što su venska staza donjih ekstremiteta koja nastaje usred uterine kompresije, smanjena mobilnost trudnice i porođaj (posebno carski rez). Ipak, ukupni rizik za razvoj DVT-a i dalje je relativno nizak i iznosi 0,1%. Rizik raste kod trudnica s nasljednom ili stečenom trombofilijom a najviši je kod nositelja kombiniranih mutacija. Dodatni rizik predstavljaju i stečeni rizični faktori, kao što su stanje nakon kirurškog zahvata, dob >35 godina, pretilost, pušenje i dugotrajnija imobilizacija (119). Ipak, najvažniji rizični faktor predstavlja pozitivna osobna ili obiteljska anamneza na DVT (120). Nisu sve trombofilije jednako rizične za razvoj DVT-a. Iako je mutacija MTHFR gena najčešće dijagnosticirani tip nasljedne trombofilije, njegova hiperhomocisteinemija predstavlja rijedak uzrok DVT-a kod trudnica (121-123). Prospektivnom studijom iz 2005. analizirano je 4885 zdravih trudnica bez dodatnih rizičnih faktora i bez prethodne TE od kojih je njih 134 (2,7%) nositelj FVL-a, a nijedna osoba tijekom trudnoće i babinja nije razvila DVT (124). Još jednom prospektivom studijom iz 2010. koja je uključila 1707 trudnica s urednim perinatalnim ishodom prethodnih trudnoća negativnim na patologiju placentarne insuficijencije i s osobnom i obiteljskom anamnezom negativnom na TE bolesti, prevalencija FVL-a iznosila je 5,39%, a PGM-a 2,38% i nijedna ispitanica nije razvila DVT (125). Ovim istraživanjima ne može se apsolutno isključiti povezanost FVL-a ili PGM-a i DVT-a, ali može se istaknuti izrazito nizak rizik za razvoj DVT-a kod asimptomatskih nositelja mutacije.

Povezanost nasljedne trombofilije s komplikacijama u trudnoći i dalje predstavlja kontroverzu. Dok većina prospektivnih studija opovrgava, retrospektivne studije naglašavaju skromnu povezanost nasljedne trombofilije i perinatalnog morbiditeta, točnije reteniranog pobačaja nakon 10.-tog tjedna trudnoće ili neponavljajuće fetalne smrti nakon 20.-tog tjedna trudnoće (124-128). Prema dosadašnjim istraživanjima, negativan utjecaj trombofilije na perinatalni ishod pronađen je samo u skupinama visokorizičnih trudnica. Najčešće su

dosadašnja istraživanja bila retrospektivna i analizirala su manje skupine, a zaključci između pojedinih studija razlikovali su se od jedne do druge.

1.3.1. Poremećaj implantacije posteljice i nasljedna trombofilija

Zbog narušavanja fiziološkog odnosa između tkiva posteljice i majčine cirkulacije, tromboza i smanjena fibrinolitička aktivnost mogu negativno utjecati na proces implantacije. Ponekad je za ponavljajuće neuspjehe embrio transfera tijekom medicinski potpomognute oplodnje odgovorna loša receptivnost endometrija ili manje vrijedan embrij. Nasljedna trombofilija sa svojim djelovanjem na cirkulaciju mogla bi također utjecati na uspjeh ili neuspjeh medicinski potpomognute oplodnje. Starije studije istaknule su negativan utjecaj trombofilije, posebice FVL-a i PGM-a, na uspješnost *in-vitro* fertilizacije (IVF). Grandone i suradnici svojom su studijom iz 2001. ukazali na neuspjeh implantacije nakon IVF-a kod nositelja FGM-a i FVL-a (129), a Qublan i suradnici su 2008. godine u svom istraživanju dokazali uspješnost heparinske profilakse za pozitivan ishod IVF-a kod žena s nasljednom trombofilijom i najmanje tri neuspješne IVF trudnoće (130). Ipak, ta su istraživanja opovrgnuta rezultatima novijih studija koje smatraju da probir na trombofiliju nije indiciran za parove s IVF neuspjehom. Kaandorp i suradnici su studijom iz 2004. ustanovili da heterozigotnost za FVL uzrokuje puno kraće vrijeme za koncepciju (11 tjedana) u odnosu na kontrolnu skupinu (23 tjedna) (OR 1,94, 95% CI 1,03-3,65), sugerirajući pozitivno djelovanje trombofilije na koncepciju (131). Također, još jednom studijom iz 2012. potvrđeno je da su osobe s nasljednom trombofilijom nakon IVF postupka imale veću stopu živorođene djece u odnosu na osobe bez prisutne mutacije, što također ide u prilog pozitivnom utjecaju trombofilije na implantaciju (132). S obzirom na kontradiktornost navedenih istraživanja, potrebne su dodatne studije za jedinstven zaključak.

1.3.2. Preeklampsija, intrauterini zastoј rasta čeda, abrupcija posteljice, fetalna smrt i nasljedna trombofilija

PE, IUGR, abrupcija posteljice i fetalna smrt predstavljaju kasne komplikacije trudnoće odgovorne za perinatalni i maternalni morbiditet i mortalitet. Pojačanim odlaganjem fibrina i trombozom uterinih i fetoplacentarnih krvnih žila, trombofilija smanjuje perfuziju te uzrokuje insuficijenciju posteljice, što predstavlja podlogu navedenoj patologiji. Utjecaj nasljedne trombofilije na kasne komplikacije trudnoće i dalje je tema brojnih istraživanja, a rezultati su kontradiktorni. Iako velika većina prospektivnih studija negira povezanost nasljedne trombofilije i rane ili kasne smrti ploda (125, 126, 128, 133), prikazi slučaja ili retrospektivne kohortne studije povezuju trombofiliju s navedenom patologijom, posebice s kasnom smrću fetusa (134, 135). Rey i suradnici su meta- analizom 2008. ustanovili povezanost FVL-a,

PGM-a i deficijencije PS-a s kasnom smrću fetusa, no nije pronađena poveznica između fetalne smrti i deficijencije PC-a i AT-a (136). Europska prospektivna kohortna studija (EPCOT) ustanovila je statistički značajniju povezanost nasljedne trombofilije (posebice AT deficijencije) s fetalnom smrću u odnosu na zadržani pobačaj (83). Iako se definicija pobačaja između dvije studije razlikuje (22 u odnosu na 28 tjedana trudnoće), oba su istraživanja jedinstvena u isticanju trombofilije kao rizičnog faktora za izoliranu kasnu fetalnu smrt u odnosu na rane gubitke trudnoće. Isti zaključak potvrđen je i kasnijim studijama (137, 138). Dosadašnja istraživanja ne nalaze uzročno posljedičnu vezu nasljedne trombofilije i intrauterinog zastoja rasta. Meta- analize ukazuju na slabu povezanost deficijencije PS-a i IUGR-a, dok se pak druge trombofilije nisu pokazale odgovornima (124-127, 139, 140). Unatoč tome što je meta- analizama kod nositelja FVL-a dokazan blago povišen rizik za razvoj PE-a (132, 141-144), prospektivne studije odbacuju bilo kakvu poveznicu (124). Također, meta- analize sugeriraju i povezanost između PS i PC deficijencije i razvoja preeklampsije. Ipak, s obzirom na heterogenost studija s malim brojem ispitanika, takav uzročno posljedični odnos postaje upitan (124-127, 140, 145). Povezanost nasljedne trombofilije i abrupcije posteljice nije dokazana (124-127, 140, 145).

1.3.3. Pobačaj

Spontani pobačaj predstavlja najčešću komplikaciju rane trudnoće čija učestalost pada s porastom gestacijske dobi. Spontani pobačaj definira se kao neželjeni gubitak ploda tjelesne težine ispod 500 grama prije 22 tjedna trudnoće. Incidencija pobačaja kod klinički prepoznate trudnoće kreće se između 8-20%, dok je incidencija u pretkliničkom razdoblju, odnosno u razdoblju predimplantacije i rane implantacije, veća i kreće se između 13% i 26% (145, 146). Brojni su rizični čimbenici koji se povezuju sa spontanim pobačajima, a među najučestalijima su majčina uznapredovala životna dob, prijašnji spontani pobačaji u anamnezi te pušenje. Najvažniji rizični čimbenik među zdravim ženama je starija životna dob majke, što je potvrđeno studijom Nybo Andersena i suradnika iz 2010., pri čemu je ustanovljena različita učestalost pobačaja među različitim dobnim skupinama: kod žena između 20 i 30 godina života: od 9% do 17%, u 35.-toj godini: 20%, u 40.-toj godini: 40% i u dobi iznad 45 godina: 80% (147). Ishodi prethodnih trudnoća također predstavljaju važan rizični čimbenik. Dvadeset posto žena sa spontanim pobačajem u osobnoj anamnezi ponovno će pobaciti, 28% žena s dva spontana imat će i treći, dok će kod 43% žena s tri spontana pobačaja i četvrta trudnoća završiti pobačajem (148). Uz to, i pušenje (>10 cigareta/dan) je čimbenik rizika (RR 1,2- 3,4) (149, 150). Nepoznat je mehanizam djelovanja cigarete na reproduktivni sustav, ali smatra se da štetan učinak potječe od vazokonstriktornog i antimetaboličkog efekta cigaretnog dima. Alkohol u većim količinama (>tri čaše/dan) također se smatra

rizičnim čimbenikom za spontani pobačaj (151). Upotreba kokaina povezuje se s prijevremenim porođajem i spontanom pobačajem, što je i potvrđeno brojnim studijama (149). Primjena nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) inhibira djelovanje prostaglandina koji imaju važnu funkciju tijekom implantacije embrija, što može utjecati na začecje i posljedične spontane pobačaje te se stoga preporuča prekid uzimanja NSAID-a kod planirane koncepcije (152, 153). Prema novijim saznanjima, manjak folne kiseline predstavlja rizik za spontani pobačaj samo kod embrija s patološkim kariogramom, odnosno niska razina folne kiseline u trudnoćama s urednim kariogramom fetusa ne predstavlja rizični faktor za spontani pobačaj (154). Unatoč tome, danas je svim trudnicama kao dio rutinske prenatalne skrbi preporučeno uzimanje folne kiseline kojim se između ostalog preveniraju defekti neuralne cijevi. Važan čimbenik za uspješnu trudnoću predstavlja i indeks tjelesne mase (ITM). Smatra se da ekstremi poput niske tjelesne težine ($ITM < 18,5$), kao i visoke tjelesne težine ($ITM > 25 \text{ kg/m}^2$), povećavaju rizik za infertilitet i spontani pobačaj. Upravo se zbog toga ženama koje pokušavaju zanijeti preporuča održavati normalan ITM.

Više od 50% uzroka spontanog pobačaja nastaje kao posljedica kromosomskih abnormalnosti ploda. Kod jednog spontanog pobačaja kromosomopatija ploda redovito je slučajan događaj dok se nakon gubitka više trudnoća kromosomskom analizom ploda najčešće pronađe autosomna trisomija, poliploidija ili manjak jednog X kromosoma. Trisomija 16 najčešće je pronađena trisomija i uvijek je letalna. Većina kromosomopatija embrija nastane „*de novo*“, a puno su rjeđe posljedica balansirane translokacije, prstenastog kromosoma, mozaicizma spolnih kromosoma ili inverzije kromosoma jednog od roditelja. Kongenitalne anomalije ploda koje nastaju kao posljedica kromosomskih ili genetskih poremećaja također mogu biti uzrok gubitka trudnoće, kao i oštećenja ploda nastala izlaganjem teratogenim ili drugim vanjskim čimbenicima (npr. eng. *amniotic band syndrome*). Invazivni dijagnostički postupci u ginekologiji, poput amniocenteze ili biopsije korionskih resica, također povećavaju rizik za spontani pobačaj (0,5%).

Brojni su majčini faktori odgovorni za spontane pobačaje. Anomalije uterusa (septum uterusa), submukozni miomi i intrauterine adhezije mogu jako ometati ili čak onemogućiti zanošenje ili dovršenje trudnoće. Insuficijencija vrata maternice označava bezbolno otvaranje, odnosno slabost vrata maternice, koje u pravilu uzrokuje ponavljajuće gubitke trudnoće starije od 14 tjedana. Pobačaji kod cervikalne insuficijencije nastupe zbog ascedentne infekcije, protruzije plodovih ovoja ili njihovog spontanog prijevremenog prsnuća. Akutne infekcije Listerijom *monocytogenes*, Toxoplasmom *gondii*, parvovirusom B19, rubeolom, HSV-om i CMV-om također se povezuju s pobačajima. U posljednje vrijeme sve je više prikaza slučaja o Zika virusu kao uzročniku spontanog pobačaja (155). Majčine endokrinopatije, poput nedostatno kontrolirane šećerne bolesti, disfunkcionalne štitnjače, Cushingovog sindroma ili policističnih jajnika, mogu uzrokovati otežano zanošenje i gubitak

trudnoće. S obzirom da je progesteron iz druge faze menstrualnog ciklusa nužan za uspjeh rane trudnoće, insuficijencija žutog tijela i posljedično smanjena produkcija progesterona mogu biti uzrok ranih pobačaja. Iako je i taj koncept i dalje kontroverzan, primjena progesterona ustalila se kao jedan od oblika terapije za prevenciju pobačaja.

1.3.3.1. Habitualni pobačaji

Ako se uzastopno izgube dvije ili više trudnoća govori se o habitualnom ili ponovljenom pobačaju. Habitualni pobačaji pogađaju oko 1% žena reproduktivne dobi i s obzirom na često nepoznatu etiologiju i samim time nemogućnost liječenja, predstavljaju jedno od najizazovnijih područja reproduktivne medicine. Problematika nastaje i zbog različitih kriterija koji se upotrebljavaju u dijagnozi. Definicije koje se danas koriste su:

- dvije ili više klinički prepoznate neuspjele trudnoće (pobačaji) dijagnosticirane ultrazvučno ili histopatološkim pregledom (156)
- tri uzastopno neuspjele trudnoće (pobačaji) neovisno o lokaciji (unutarmaterične ili izvanmaterične) (157)

Određene analize u habitualne pobačaje kod žena koje su u IVF postupku ubrajaju i biokemijske trudnoće s obzirom da je studija iz 2014. pokazala da broj biokemijskih trudnoća, jednako kao i broj reteniranih pobačaja, tj. anembrionalnih trudnoća, ima negativan utjecaj na stopu živorođene djece (158). Kao odgovor na ove različite kriterije, Europsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju (eng. *European Society of Human Reproduction and Embryology*, (ESHRE)) 2015. godine postavilo je definiciju habitualnih pobačaja kao ponavljajući pobačaji neovisno o lokaciji unutar reproduktivnog sustava (unutarmaterični ili izvanmaterični) (159).

Habitualni pobačaji dijele se na primarne ili sekundarne. Primarni se odnosi na pobačaje kod žena koje nikada nisu imale vijabilnu trudnoću, dok sekundarni obuhvaćaju one žene koje prethodno imaju živorođeno dijete. Žene sa sekundarnim habitualnim pobačajima imaju bolju prognozu za sljedeću uspješnu trudnoću.

Incidencija dva uzastopna spontana pobačaja je 2%, dok će svega 0,4%-1% žena imati tri uzastopna pobačaja (160). Nažalost, uzrok habitualnih pobačaja danas je poznat u samo 50% slučajeva. Etiologija obuhvaća anatomske, imunološke, genetske, endokrinološke, infektivne i okolišne čimbenike te trombofiliju.

Kod prve trudnoće rizik za spontani pobačaj iznosi oko 11%-13%, dok je nakon jednog pobačaja rizik za drugi 14%-21%, a nakon dva pobačaja rizik za treći raste na 24%-29%. Uzrok pobačaja najčešće utječe na njegovo ponavljanje. Npr. ženama koji su nositeljice translokacije 22:22 svaka trudnoća završit će pobačajem, dok žene s translokacijom 13:14 imaju 25%-tni rizik za ponovni pobačaj. Starija životna dob majke također utječe na

habitualne pobačaje. Starenjem žene smanjuje se kvaliteta oocita i samim time raste učestalost spontanijih pobačaja. Tjedan trudnoće je također bitan u određivanju etiologije i rizika za ponovljeni pobačaj. Naime, habitualni pobačaji najčešće nastaju u istom tjednu trudnoće, a rizik ponavljanja je veći ako se pobačaji dogode u višem tjednu (161).

Većina prethodno navedenih uzroka spontanijih pobačaja uzrok su i habitualnih pobačaja. Stečene i kongenitalne uterine anomalije, a posebno septum uterusa, odgovorne su za 10%-50% habitualnih pobačaja.

Imunološki sustav mogući je razlog klinički „nevidljivog“ uzroka pobačaja. Embrij i posteljično tkivo, točnije trofoblast, imaju na svojim stanicama antigene nepoznate majčinom imunološkom sustavu. Ipak, zbog brojnih prilagodbi specifičnih za trudnoću, majčin sustav fetalne antigene ne prepoznaje kao strane, čime je spriječena klasična imunološka reakcija odbacivanja stranog tkiva. Majčin imunološki odgovor u trudnoći drugačiji je nego izvan nje, HLA-G antigeni na trofoblastu ne razlikuju se od majčinijih HLA-G antigena pa ih zbog toga sustav ne prepoznaje kao strane, a stanice ploda s HLA antigenima u normalnim uvjetima ne prodiru u majčin krvotok. Smatra se da je izostanak prilagodbe majčinog imunološkog sustava na fetalni jedan od mogućijih uzroka habitualnih pobačaja. Pobačaj može nastati kao posljedica nenormalnog imunološkog odgovora majke na fetalne antigene (162) ili izostanka u trudnoći normalne ekspresije HLA-G antigena na stanicama sincicio – i citotrofoblasta (163). Imunogeni uzrok navedenijih pobačaja temelji se na autoimunim i aloimunim čimbenicima. Autoimune čimbenike karakterizira povišeni titar antifosfolipidnih protutijela (LAC) ili antikardiolipinskih protutijela (ACA) i oni su odgovorni su za oko 15% ponovljenijih spontanijih pobačaja. Kod žena s jednim spontanijim pobačajem i pozitivnim titrom antifosfolipidnih protutijela, mogućnost sljedećeg pobačaja raste na 70%. Aloimuni čimbenici mogu uzrokovati habitualni pobačaj po istom principu na kojem funkcionira „graft versus host“ bolest kod transplantacija. Ako su razvoj i rast blastociste uredni, embrij će se normalno razvijati u potpunosti zaštićen stanicama trofoblasta. Ako je blastocista zbog genetskih mutacija oštećena, embrij više nije zaštićen slojem stanica i očevi antigeni su izloženi majčinom imunološkom sustavu, pri čemu dolazi do reakcije odbacivanja tkiva. Sljedeća trudnoća još brže potencira reakciju odbacivanja kod već senzibiliziranog organizma.

Ako su i dalje nekontrolirane, endokrinopatije majke (dijabetes melitus, sindrom policističnih jajnika, disfunkcija štitnjače, hiperprolaktinemija, defekt luteinske faze) koje su uzroci spontanijih pobačaja, postaju uzroci i onijih ponavljajućijih.

Kao što je već navedeno, poremećaji u broju ili strukturi kromosoma jedan su od najčešćijih razloga sporadićnijih, ali isto tako i habitualnih pobačaja. U 3%-5% slučajeva kod parova s habitualnim pobačajima ustanoviti će se da je jedan od partnera nositelj nekog oblika kromosomskog preslagivanja, balansirane translokacije ili inverzije kromosoma (164, 165).

Utjecaj nasljedne trombofilije na rani gubitak trudnoće tema je brojnih studija, a mišljenja su još uvijek neusklađena. Poremećaj zgrušavanja uzrokovan trombofilijom mogao bi uzrokovati trombozu spiralne arterije i intervalnog prostora na majčinoj strani posteljice čime bi se smanjila perfuzija posteljičnog tkiva prijeko potrebna za rast i razvoj ploda. Tako nastala insuficijencija posteljice može biti odgovorna za fetalnu smrt, IUGR, abrupciju posteljice ili PE. Manje je jasan odnos između insuficijencije uteroplacentarne cirkulacije i pobačaja. Brojne prospektivne studije opovrgavaju tu povezanost. Said i suradnici prospektivnom studijom iz 2010. ističu slabu povezanost nasljedne trombofilije i ranih i kasnih komplikacija trudnoće. Autori zaključuju da će većina asimptomatskih žena s nasljednom trombofilijom imati uspješan perinatalni ishod (125). Isti zaključak 2010. u svojoj studiji donose i Silver i suradnici (127), kao i Dizon-Towson i suradnici pet godina ranije (124). Roque i suradnici su u svojoj studiji analizirali povezanost nasljedne i stečene trombofilije s ranim, odnosno kasnim, komplikacijama u trudnoći. Žene s višestrukim mutacijama imale su statistički značajno manji broj spontanih pobačaja u odnosu na patologiju kasne trudnoće (fetalna smrt) (166).

Većina znanstvenika, neovisno o zaključcima o povezanosti trombofilije s lošim perinatalnim ishodom, trombofiliju smatra većim rizičnim čimbenikom za kasne u odnosu na rane komplikacije trudnoće (83, 137, 138). Paradoks protektivnog djelovanja trombofilije na razvoj ploda u ranoj trudnoći može se objasniti nižom razinom kisika koja je potrebna za optimalan razvoj embrija. U fiziološkom smislu, u ranoj trudnoći vladaju hipoksični uvjeti (od osmog do desetog tjedna amenoreje normalna razina O_2 kreće se oko $17 \pm 6,9$ mmHg, a u 13.-om tjednu trudnoće iznosi oko $60,7 \pm 8,5$ mmHg) koji osiguravaju urednu infiltraciju trofoblasta u intervalni prostor te posljedično nizak otpor uteroplacentarne cirkulacije (167, 168). Smatra se da bi kisik čak mogao biti toksičan u tako ranoj trudnoći. Upravo bi zbog toga trombofilija, sa svojim trombotičkim djelovanjem na smanjen dotok kisika, mogla više štetiti u kasnoj nego u ranoj trudnoći.

U posljednje vrijeme brojne su studije analizirale još jedan oblik nasljedne trombofilije koji bi mogao imati ulogu u habitualnim pobačajima. Riječ je o M2 haplotipu koji je odgovoran za ekspresiju annexin A5 gena (169-173). Annexin A5 je posteljični anikoagulacijski protein koji funkcionira kao inhibitor koagulacije vežući se za fosfolipide izložene na površini stanica, npr. vežući se na trombocite inhibira njihovu agregaciju. Annexin oblaže apikalni dio sinciotrofoblasta i tako djeluje kao njegov zaštitni sloj. Mutacijom i stvaranjem annexin A5 genske varijante dolazi do promjene njegovih antikoagulacijskih svojstava. Ustanovljeno je da se u prisutnosti antifosfolipidnih protutijela koncentracija annexina A5 smanjuje. Annexin A5 genska varijanta mogla bi biti odgovorna za veliki postotak habitualnih pobačaja nepoznate etiologije.

Klinička obrada parova s habitualnim pobačajem uključuje detaljnu osobnu i obiteljsku anamnezu te ginekološku obradu. Uz kariotipizaciju obaju partnera potrebno je napraviti i kompletnu krvnu sliku, funkcionalne testove štitnjače, laboratorijske pretrage na nasljednu trombofiliju i antifosfolipidna protutijela. S obzirom da je etiologija pobačaja nepoznata u oko 50% parova, liječenje je zasada moguće samo u skupini negenetičke etiologije. Nakon postavljanja dijagnoze stečene trombofilije, odnosno antifosfolipidnog sindroma, liječenje se započinje kombinacijom NMH-a i aspirina. Liječenjem se smanjuje stopa spontanih pobačaja za 54% (174, 175). Ako se stečena trombofilija javlja u sklopu sistemskih bolesti, poput sistemskog eritemskog lupusa, u terapiju je potrebno uključiti i glukokortikoide. Osobama sa stečenom trombofilijom koje u osobnoj anamnezi imaju i TE bolesti preporučeno je uzimati NMH i tijekom trudnoće i postpartalno tijekom babinja.

1.4. TERAPIJSKI PRISTUP TRUDNICAMA S NASLJEDNOM TROMBOFILIJOM

Kod trudnica s nasljednom trombofilijom cilj liječenja je prevencija DVT-a i drugih komplikacija koje ona može uzrokovati. Ukoliko se odluči na liječenje ili profilaksu, antikoagulacijska terapija započinje se paralelno s pozitivnim kucajevima čedinjeg srca (KČS), tj. na samom početku trudnoće. Administraciju heparina potrebno je prekinuti s početkom porođaja ili par sati prije dogovorenog carskog reza da bi se smanjio rizik hemoragičnih komplikacija. Terapija se potom nastavlja četiri do šest sati nakon vaginalnog poroda, odnosno šest do 12 sati nakon carskog reza, i održava se, ovisno o indikaciji, sljedeća dva tjedna ili kroz cijelo razdoblje babinja. Indikacija, doziranje i duljina primjene NMH-a razlikuje se između pojedinih ustanova. U Klinici za ženske bolesti i porođaje trudnicama s visokorizičnom trombofilijom (nositelji FVL-a, nositelji mutacije protrombinskog gena, dvostruki heterozigoti za FVL i protrombin, nositelji deficijencije AT-a, PS-a i PC-a) s pozitivnom obiteljskom ili osobnom anamnezom na TE bolest, preporučuje se terapijska doza NMH-a, a trudnicama s osobnom ili obiteljskom anamnezom negativnom na DVT preporučuje se profilaktična doza heparina. Prema smjernicama institucije *American College of Chest Physicians (ACCP)* trudnicama s visokorizičnom trombofilijom i osobnom i obiteljskom anamnezom negativnom na TE bolesti preporučuje se antikoagulacijska profilaksa postpartalno, a ako je obiteljska anamneza pozitivna na DVT, antikoagulans je preporučen tijekom trudnoće i babinja (176). Američko društvo opstetričara i ginekologa (ACOG) trudnicama s nasljednom trombofilijom (FVL, PGM, deficijencija PC-a, PS-a i AT-a) i pozitivnom osobnom anamnezom na DVT, preporučuje antikoagulacijsku profilaksu u trudnoći i u babinju. Asimptomatskim nositeljima mutacija na nasljednu trombofiliju preporučuje se individualan pristup u određivanju dodatnih rizika za razvoj DVT-a u svrhu uzimanja antikoagulacijske profilakse. Ako su prisutni dodatni rizični čimbenici (npr.

dugotrajna imobilnost, pretilost), trudnicama se uvodi profilaktična doza NMH-a u trudnoći i babinju (216).

Kao što je prethodno navedeno, većina dokaza potvrđuje da je nasljedna trombofilija uzročnik kasnih gubitaka trudnoće, a u slučaju ranih gubitaka čak se spominje njeno protektivno djelovanje. S obzirom na brojne kontradikcije i neusuglašenosti između uzročno-posljedične veze nasljedne trombofilije i habitualnih pobačaja, povlači se pitanje opravdanosti primjene heparinske terapije, odnosno, može li heparin kod trudnica s habitualnim pobačajima poboljšati ishod sljedeće trudnoće. Unatoč tome što ima veliku terapijsku primjenu, molekula heparina ima i svojstva koja su danas još uvijek nepoznata (177, 178). Multifunkcionalnost heparina dovodi u pitanje koja su (poznata ili nepoznata) svojstva molekule heparina najviše odgovorna za mogući pozitivan učinak kod trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajem.

Ovim radom želi se analizirati utjecaj heparina na perinatalni ishod kod trudnica s habitualnim pobačajima koje su nositelji nasljedne trombofilije. Također, očekuje se da će se rezultatima ovog istraživanja suziti ili proširiti indikacije za primjenu heparina kod asimptomatskih, kao i simptomatskih, nositelja nasljedne trombofilije.

2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Za očekivati je da će se kod trudnica s dva ili više zadržana pobačaja u anamnezi i dijagnozom nasljedne trombofilije primjenom profilaktične doze niskomolekularnog heparina poboljšati perinatalni ishod, odnosno da će trudnoća završiti terminskim porođajem. U skupini trudnica s nasljednom trombofilijom te osobnom i opstetričkom anamnezom negativnom na tromboembolijske bolesti za očekivati je da primjena antikoagulacijske terapije neće značajnije utjecati na perinatalni ishod. Primjena niskomolekularnog heparina opravdana je kod trudnica s dokazanom nasljednom trombofilijom i anamnezom opterećenom habitualnim pobačajima za bolji perinatalni ishod.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

OPĆI CILJ: ustanoviti opravdanost primjene niskomolekularnog heparina u svrhu poboljšanja perinatalnog ishoda kod trudnica s nasljednom trombofilijom i stanjem nakon dva ili više zadržana pobačaja.

SPECIFIČNI CILJEVI: Ustanoviti zastupljenost nasljedne trombofilije u populaciji zdravih trudnica bez opterećene opstetričke anamneze.

Ustanoviti perinatalni ishod u skupini asimptomatskih nositelja mutacije gena za nasljednu trombofiliju bez primjene niskomolekularnog heparina.

Ustanoviti najčešći tip nasljednih trombofilija na našim područjima.

Odrediti najčešću mutaciju gena za nasljednu trombofiliju koja uzrokuje ponavljane zadržane pobačaje.

4. ISPITANICE I METODE

4.1. ISPITANICE I NAČIN ISTRAŽIVANJA

Prospektivno istraživanje provedeno je u Klinici za ženske bolesti i porođaje Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu u razdoblju od listopada 2011. do siječnja 2018. godine. Istraživanjem su od 2011. do 2013. obuhvaćene dvije skupine ispitanica koje su primljene u Kliniku za ženske bolesti i porođaje zbog obrade i liječenja. Prva skupina (NMH+ skupina) obuhvaćala je 133 trudnice s dva ili više uzastopna zadržana pobačaja (eng. *missed abortion*) i dijagnozom nasljedne trombofilije. Neke su od njih već imale postavljenu dijagnozu nasljedne trombofilije koja je uključivala FVL, protrombin G20210A mutaciju, deficijenciju proteina C, deficijenciju proteina S, deficijenciju antitrombina, mutaciju PAI-1 gena te mutaciju MTHFR gena. Trudnicama s dva ili više zadržana pobačaja koje nisu imale dijagnozu trombofilije kod prijema su provedeni testovi na nasljednu trombofiliju i ako se ona dokazala, trudnice su uključene u istraživanje. Svim trudnicama prve skupine nakon ultrazvučno ustanovljenih pozitivnih KČS-ova u terapiju se uveo NMH u profilaktičnoj dozi koji je održavan kao profilaksa do porođaja te dva tjedna nakon porođaja. Trudnicama kojima je trombofilija naknadno dokazana, NMH je uključen po primitku nalaza. Uključni kriteriji prve skupine bili su prvorotkinja ili višerotkinja s jednoplodnom trudnoćom i dosadašnje trudnoće kao i sadašnja s istim partnerom. Isključni kriteriji prve skupine bili su žene starije od 37 godina, žene koje boluju od kroničnih bolesti kao što su šećerna bolest, bolesti štitnjače i autoimune bolesti, žene koje su zanijele potpomognutom oplodnjom ili su na bilo koji drugi način liječene zbog primarnog ili sekundarnog steriliteta, žene s verificiranim anomalijama

maternice, partneri s kromosomskim anomalijama, žene s pozitivnim LAC-om i antikardiolipinskim protutijelima. Zadatak uključnih, odnosno isključnih, kriterija bio je „pročistiti“ ispitivane skupine od znanih uzroka pobačaja i izolirati trombofiliju kao jedini potencijalni „vidljivi“ uzrok.

Kontrolna skupina ispitanica obuhvaćala je 90 nulipara, prvorotkinja ili višerotkinja bez opstetričkih komplikacija koje su, upućene od strane nadležnog ginekologa, u prvom tromjesečju trudnoće dolazile na redovite preglede u ultrazvučnu ili trudničku ambulantu Klinike za ženske bolesti i porođaje. Nakon usmenog informiranja trudnice, o istraživanju je obaviješten i njen nadležni ginekolog informativnim letkom. Ponovnim dolaskom ispitanice u Kliniku provedeni su testovi trombofilije. U skupini od 90 zdravih trudnica kod njih 55 (61,2%) utvrđena je jedna ili više mutacija za nasljednu trombofiliju. Trudnice s nasljednom trombofilijom uključene su u istraživanje. Neovisno o rezultatima testa i tipu mutacije, kod trudnica kontrolne skupine nije uključena profilaksa NMH-om. Uključni kriteriji kontrolne skupine bili su jednoplodna trudnoća i osobna anamneza bez tromboembolijskih incidenata. Isključni kriteriji bili su žene starije od 37 godina, prethodni TE incidenti u osobnoj anamnezi i prisutnost LAC-a ili antikardiolipinskih protutijela. Navedenim kriterijima isključene su stečena trombofilija i opterećena osobna anamneza kao rizični čimbenici koji bi zahtijevali uvođenje NMH-a.

Posljednjih 20-tak godina tema trombofilije i njenog utjecaja na trudnoću budi interes brojnih znanstvenika na području biomedicine. S obzirom na nepoznanicu koje su mutacije predstavljale i na brojne kontradiktornosti koje su se provlačile kroz studije, velika većina ginekologa u Republici Hrvatskoj, kao i drugdje u svijetu, uvodila je heparinsku profilaksu neovisno o sigurnosti uzročno posljedične veze određene mutacije s patologijom trudnoće koje su pojedine trudnice imale. Ipak, sve češći individualizirani pristup pacijentima postupno je doveo do racionalizacije propisivanja antikoagulanata. Samim time je od 2013. godine u istraživanje uključena još jedna eksperimentalna skupina (NMH-) koja je obuhvaćala 35 trudnica s nasljednom trombofilijom i dva ili više uzastopnih zadržanih pobačaja, a kojima u profilaksu nije uveden NMH. Određeni broj trudnica iz posljednje skupine kontrolirali su primarni ginekolozi tijekom cijele trudnoće i tek su po porođaju dolazile u Kliniku, dok je ostatak njih redovito kontroliran i porođen u tercijarnom centru. Uključni i isključni kriteriji druge skupine bili su jednaki uključnim i isključnim kriterijima prve skupine.

Ispitanice u sve tri skupine uzimale su pripravke folne kiseline, ili od početka trudnoće ili prekonceptijski.

Testovi za nasljednu trombofiliju obuhvaćali su analizu FV, PG-a, MTHFR gena, PAI-1 gena, vrijednosti AT-a, PC i PS. FVL, mutacija protrombinskog gena, mutacija MTHFR i PAI-1 gena određivale su se u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu na Odjelu za molekularnu dijagnostiku. Vrijednosti AT-a i PC određivale su se u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku

medicinu na Odjelu za trombocitnu i leukocitnu dijagnostiku i hemostazu. PS se određivao u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku na Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Faktori stečene trombofilije, antikardiolipinska protutijela razreda aCl- IgG i aCl- IgM i LAC određivali su se na Odjelu za laboratorijsku imunologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Deskriptivna analiza kohortnih skupina uključila je životnu dob trudnice, indeks tjelesne mase (ITM) prije trudnoće, paritet (nulipara, primipara, multipara) i broj zadržanih pobačaja (eng. *missed abortion*) (dva, tri ili više od tri). U obiteljskoj, kao i u osobnoj, anamnezi analizirala se prisutnost tromboembolijskih incidenata u obliku infarkta miokarda (IM), moždanog udara (CVI), plućne embolije (PE) ili duboke venske tromboze (DVT). Obiteljska anamneza uzimala je u obzir bližu rodbinu ispitanice: otac, majka, brat/sestra, djed i baka. Ispitanicama s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima (NMH+ i NMH-) analizirao se tjedan u kojima su uzastopni pobačaji nastupili. Rani gubitak trudnoće definirao se kao pobačaj prije 12 tjedana trudnoće, a kasni gubitak trudnoće kao zadržani pobačaj nakon 12.-og, a prije 22.-og tjedna trudnoće. Ako su imale porođaje prije sadašnje trudnoće, ispitanicama NMH+ i NMH- skupine analizirao se tijek i ishod prethodnih trudnoća. Praćene varijable odnosile su se na prethodno mrtvorodeno dijete, komplikacije prethodnih trudnoća i ishod prethodnih trudnoća. Mrtvorodenost se definira kao porođaj mrtvog čeda čija je gestacijska dob >22 tj. ili tjelesna težina >500 grama. Komplikacije prethodnih trudnoća odnose se na patologiju trudnoće koja je posljedica poremećene infiltracije trofoblasta, GH, PE, HELLP sindrom. Ishod prethodnih trudnoća analizirao je prijevremeni porođaj (porođaj prije 37.-og tjedna amenoreje), ultrazvučno dijagnosticirano intrakranijalno krvarenje neonatusa i porođaj neonatusa s porođajnom težinom ispod 10.-e centile za gestacijsku dob (Slika 6.).

centile														
tjedni	5	10	25	50	75	90	95	5	10	25	50	75	90	95
Prvorotkinje muški							Prvorotkinje ženski							
28	940	960	980	1090	1280	1410	1450	980	980	1060	1080	1270	1310	1320
29	1000	1020	1090	1240	1430	1560	1570	950	1010	1120	1210	1350	1410	1480
30	1040	1110	1240	1410	1600	1730	1760	980	1080	1220	1360	1470	1600	1670
31	1120	1230	1400	1590	1780	1920	1970	1060	1190	1360	1530	1640	1800	1890
32	1240	1380	1590	1780	1980	2140	2210	1180	1340	1530	1720	1850	2020	2120
33	1380	1550	1780	1990	2190	2360	2460	1340	1510	1710	1920	2070	2250	2370
34	1540	1740	1990	2200	2410	2590	2710	1530	1700	1910	2130	2310	2500	2620
35	1730	1930	2200	2410	2630	2830	2970	1730	1910	2120	2340	2560	2740	2880
36	1920	2130	2410	2620	2850	3060	3230	1930	2110	2330	2550	2800	2990	3130
37	2120	2330	2610	2830	3070	3290	3480	2140	2300	2530	2750	3030	3220	3360
38	2320	2520	2800	3030	3280	3510	3710	2330	2490	2720	2950	3240	3440	3580
39	2520	2710	2980	3230	3480	3720	3920	2450	2650	2890	3120	3420	3630	3780
40	2700	2870	3130	3400	3670	3910	4100	2640	2780	3030	3280	3560	3800	3940
41	2860	3010	3270	3560	3840	4070	4250	2740	2870	3140	3410	3650	3940	4070
42	3000	3130	3370	3700	3990	4210	4360	2790	2920	3200	3500	3690	4030	4150
Višerotkinje muški							Višerotkinje ženski							
28	1040	1070	1180	1270	1400	1440	1830	1020	1040	1050	1200	1200	1250	1370
29	1050	1100	1270	1360	1510	1570	1900	1000	1060	1030	1280	1380	1460	1560
30	1110	1170	1390	1490	1640	1740	2020	1040	1130	1250	1400	1570	1670	1770
31	1210	1290	1540	1650	1800	1930	2170	1130	1240	1390	1560	1760	1890	2000
32	1350	1440	1700	1820	1980	2140	2350	1260	1380	1560	1740	1960	2110	2240
33	1510	1610	1890	2020	2190	2370	2560	1420	1560	1750	1940	2160	2340	2480
34	1690	1810	2080	2230	2410	2610	2780	1600	1750	1950	2150	2370	2570	2740
35	1880	2020	2290	2450	2640	2860	3020	1800	1950	2150	2370	2580	2800	2990
36	2090	2230	2490	2670	2880	3120	3270	2000	2160	2360	2600	2800	3040	3240
37	2300	2450	2700	2900	3120	3370	3530	2210	2370	2570	2820	3010	3280	3490
38	2500	2660	2900	3110	3360	3630	3780	2420	2570	2770	3030	3230	3520	3730
39	2700	2850	3090	3320	3600	3880	4030	2610	2570	2960	3220	3450	3770	3960
40	2890	3030	3260	3510	3830	4120	4260	2790	2910	3130	3390	3680	4020	4180
41	3050	3180	3420	3680	4050	4340	4480	2930	3040	3280	3540	3900	4270	4380
42	3190	3290	3550	3820	4260	4550	4670	3040	3130	3400	3650	4130	4530	4560

Slika 6. Centilne vrijednosti težine novorođenčadi po rodnosti majke i spolu djeteta u Zagrebu 1982. godine. *Preuzeto: Dražančić A., Porodništvo, 1994.*

Promjena broja trombocita tijekom heparinske profilakse analizirala se dvjema varijablama: brojem trombocita prije uvođenja heparinske profilakse (kod trudnica kojima je profilaksa započeta tijekom hospitalizacije trombociti su se određivali kod prvog dolaska u bolnicu, a kod trudnica koje su primljene s heparinskom profilaksom broj trombocita uzimao se iz medicinske dokumentacije ako je prethodno određivana krvna slika) i brojem trombocita tijekom profilakse heparinom (tijekom zadnje hospitalizacije, tj. krajem trećeg tromjesečja).

U sve tri skupine ispitanica pratio se tijek sadašnje trudnoće (analizirala se patologija trudnoće ako ju je trudnica razvila, pobačaj u aktualnoj trudnoći ako se dogodio, patologija fetusa ako ju je fetus razvio), način i tjedan završetka trudnoće i rani neonatalni ishod. Uredna trudnoća ispitanice definirana je prosječnim tlakom <130/85mmHg, koncentracijom proteina u urinu unutar referentnih vrijednosti (<0,3 g/L) te završetkom trudnoće terminskim porođajem (od 37.-og do 42.-og tjedna amenoreje). Patologija trudnoće definirana je stanjima koje nastaju kao posljedica patološke infiltracije trofoblasta u ogranke arterije uterine (spiralna arterija) što uzrokuje razvoj gestacijske hipertenzije, preeklampsije, HELLP sindroma i abrupcije posteljice. Pobačaj je definiran kao spontani gubitak ploda prije 22.-og tjedna trudnoće, odnosno gubitak ploda lakšeg od 500 grama tjelesne težine. Svim

pobačenim plodovima nakon kiretaže učinjena je citogenetska analiza. Uredan rast i razvoj fetusa definiran je ultrazvučno procijenjenom tjelesnom težinom fetusa koja se kreće između 10. i 90. centile za gestacijsku dob. Ultrazvučna 2D procjena TT ploda temelji se na standardnim biometrijskim mjerenjima koja obuhvaćaju opseg fetalnog abdomena (AC), biparijetalni promjer (BPD), promjer glavice (HC) i duljinu femura (FL). Navedene mjere potom se uvrštavaju u Hadlock II formulu, a rezultat se prikazuje na krivulji fetalnog rasta u odnosu na gestacijsku dob. Patologija fetusa definirana je intrauterinim zastojem rasta (IUGR) što označava ultrazvučno procijenjeni rast ispod 10. centile za gestacijsku dob uz ultrazvučno dijagnosticiranu fetalnu centralizaciju krvotoka (eng. *brain-sparing effect*; omjer sistoličko-dijastoličkih omjera između središnje cerebralne arterije i pupčane arterije $\leq 1,08$). Analiza načina završetka trudnoće uključivala je vaginalni porođaj ili porođaj carskim rezom (elektivni + hitni carski rez). Uredan neonatalni ishod definiran je kao porođaj novorođenčeta čija je tjelesna težina na porođaju između 10. i 90. centile za gestacijsku dob, ukupne vrijednosti Apgar indeksa 10 nakon jedne minute te 10 nakon pet minuta i pH vrijednosti umbilikalne arterije između 7,25-7,35 ukoliko je pH mjeren. Rano neonatalno razdoblje započinje porođajem, a traje sedam dana. Patološki rani neonatalni ishod definiran je javljanjem jedne ili svih navedenih promjena: porođajem novorođenčeta tjelesne težine ispod 10. centile za gestacijsku dob, niskom ocjenom po Apgar-ovoj (<10) i pH vrijednosti umbilikalne arterije $<7,25$.

Pojam babinje ili puerperij odnosi se na razdoblje od šest tjedana koje započinje dva sata nakon porođaja. Uredno razdoblje babinja označava babinjaču koja tijekom babinja nije razvila tromboembolijske incidente poput DVT-e, PE-e, CVI-ja ili IM-a.

S obzirom na različit utjecaj pojedinih mutacija gena za nasljednu trombofiliju na ishod trudnoće, ispitanice su tijekom analize podijeljene na nositeljice „teških“, odnosno „blagih“ mutacija. „Teškim“ mutacijama su nazvane mutacije koje su češće povezane s tromboembolijskim incidentima krvožilnog sustava i obuhvaćaju FVL, mutaciju protrombin gena, deficijenciju antitrombina, deficijenciju proteina S i deficijenciju proteina C. „Blage“ mutacije rjeđe su uzročnici TE-a, a pojam se odnosi na mutacije MTHFR i PAI-1 gena.

Prije uključivanja u istraživanje ispitanice i njihov nadležni ginekolog (ako se radilo o kontrolnoj skupini) dobili su informativni letak u kojem je objašnjena svrha i pojedinosti istraživanja. Hospitaliziranim trudnicama uz informativni letak istraživanje je objašnjeno i usmeno.

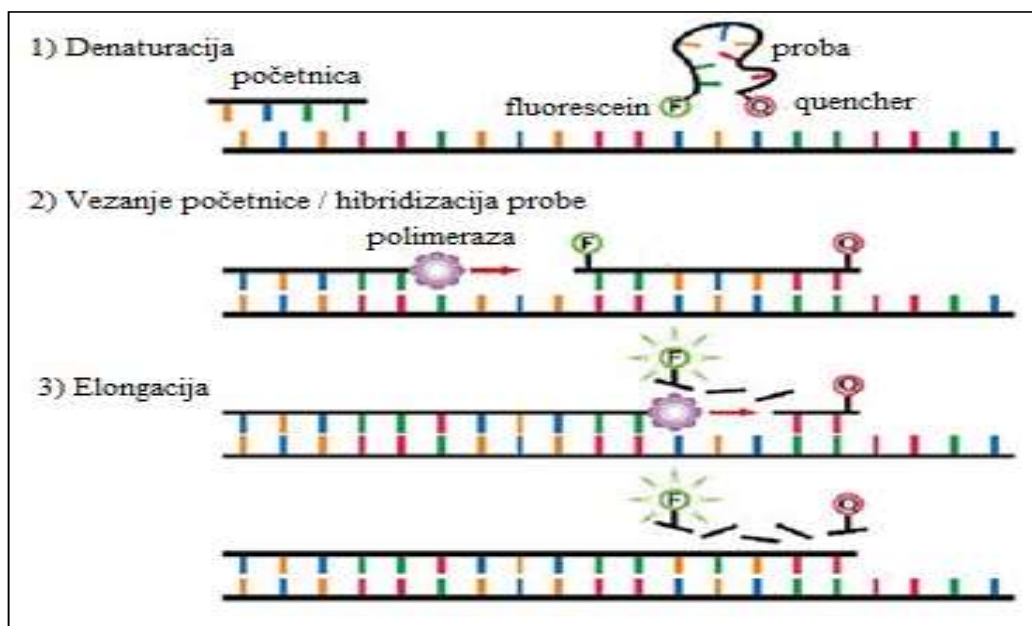
4.2. LABORATORIJSKE METODE

Primjena molekularno-bioloških metoda u analizi humanog genoma ovisi o izolaciji kvalitetne pročišćene DNA. Humana DNA može se izolirati iz pune krvi (leukocita), tkiva, urina,

primarnih staničnih kultura, arhivskog materijala tkiva uklopljenog u parafin. Tijekom istraživanja genomska DNA dobila se iz leukocitnog sloja (eng. *buffy coat-a*) a za njenu izolaciju korišteni su komercijalni kitovi QIAamp DNA Blood Mini kita (Qiagen, Njemačka). QIAcube uređaj je robotska radna stanica za automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina i koristi već postojeće standardne QIAgen kitove za izolaciju nukleinskih kiselina na kolonama (silika gel membrane) i njihove protokole. U ovoj studiji korišten je protokol QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (Qiagen, Njemačka). Za izolaciju DNA upotrebljavao se volumen EDTA uzorka od 200 µL. Proces automatizirane izolacije DNA za 12 uzoraka na uređaju QIAcube traje 90 minuta. Izolirana DNA eluirana je u 200 µL pufera za eluciju AE. Silika- gel membrane razdvajaju DNA od ostalih komponenti kao što su polisaharidi i proteini postupkom vezanja, ispiranja i eluiranja, dok se apsorpcija nukleinskih kiselina na silika- gel membranu odvija uz pomoć kaotropnih soli koje uklanjaju vodu iz hidratiziranih molekula u otopini. Ispiranjem s dva različita pufera (AW1 i AW2), nukleinska kiselina elui se u malom volumenu te je pripremljena za uporabu bez daljnjeg ukoncentriravanja. Tako izolirana genomska DNA visokog je stupnja čistoće za izvođenje lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real-time PCR, od engl. *Polymerase Chain Reaction*).

4.2.1. Genotipizacija faktora V Leiden, prothrombinskog gena, mutacije MTHFR te PAI-1 pomoću metode *real-time PCR*

Real-time PCR pouzdana je i precizna metoda koja se koristi za umnažanje i istodobnu kvantifikaciju ciljnih sljedova DNA. Za real-time PCR neophodna je dobro izolirana DNA, optimalno izabrani primjeri za reakciju i optimizirani svi stupnjevi PCR reakcije (denaturacija, izbor i uvjeti vezanje primera, sinteza DNA-elongacija komplementarnog DNA lanca). Umnožavanje DNA prati se preko ugradnje obilježenih početnica u PCR produkt, pri čemu se generira porast intenziteta fluorescencije. Real-time TaqMan PCR tehnologija koristi dvostruko označenu fluorescentnu probu, reporter boja koja emitira fluorescentnu svjetlost vezana je za 5' kraj TaqMan probe, dok je prigušivač boje (engl. *Quencher*; onaj koji gasi) vezan za 3' kraj. Potom enzimTaq polimeraza dodaje nukleotide 3'-5' nakon čega istovremeno dolazi i do uklanjanja TaqMan probe s kalupa DNA zbog 5'-3' egzonukleazne aktivnosti. Ovim se postupkom prigušivač fluorescencije udaljava od reporter boje te ona emitira fluorescenciju jer se prigušivač više ne nalazi na odgovarajućoj udaljenosti od reportera i nema blokade emisije. Uz pomoć intenziteta emisije fluorescencije reporter boje prati se nastanak PCR produkata tijekom vremena te se stoga postupak i naziva „on-line“ PCR. Količina fluorescencije razmjerna je količini PCR proizvoda (Slika 7.).



Slika 7. Real-time TaqMan PCR tehnologija

Kao što je navedeno, RT-PCR metoda za određivanje genotipa, tj. za alelnu diskriminaciju, koristi dvije dvostruko označene fluorescentne TaqMan probe koje se razlikuju u jednoj ciljnoj bazi i obilježene su različitim bojama. One emitiraju različitu fluorescenciju. Jedna od njih veže se za alel 1 (divlji tip, alel bez mutacije), a druga se veže za alel 2 (mutirani alel). Ako RT-PCR uređaj detektira jednu boju – prisutan je jedan alel, ako detektira drugu boju – prisutan je drugi alel, a detekcija obje boje istovremeno označava prisutnost heterozigota.

Kada komplementarno vezivanje nije ostvareno i kada je proba intaktna, fluorescencija reporter boje onemogućena je blizinom boje koja gasi. Postupkom umnažanja, polimeraza razgrađuje probu što dovodi do oslobađanja i odvajanja reporter boje od boje koja gasi i povećanja fluorescencije reporter boje. Signal fluorescencije normalizira se kada se uskladi emisija intenziteta reporter boje s emisijom referentne boje koja je uključena u reakcijsku smjesu. Intenzitet fluorescencije reporter boje povećava se razmjerno povećanju količine umnoženog produkta. Odnos signala fluorescencije i broja ciklusa umnožavanja grafički prikazuje amplifikacijska krivulja u kojoj bazičnu liniju čine početni ciklusi umnažanja u kojima ne dolazi do velikih promjena u signalu fluorescencije. Umnoženi produkt manifestirat će se kao povećanje fluorescencije iznad bazične linije. *Threshold cycle* (Ct) predstavlja broj ciklusa u kojem intenzitet fluorescencije prelazi intenzitet praga. S real-time PCR tehnologijom u kojoj uređaj kontinuirano mjeri fluorescenciju u svim uzorcima tijekom umnažanja, omogućeno je jednostavno i brzo detektiranje točkastih mutacija metodom alelnu diskriminacije.

Pojava signala fluorescencije reporter boje označava efikasnosti umnažanja pojedinog alela, a omjerom intenziteta fluorescencije reporter boja (FAM i VIC) može se odrediti koji se alel dominantno umnaža. Umnažanjem divljeg tipa alela prisutan je signal fluorescencije reporter boje kojom je označena proba za divlji tip alela. Kao što je prethodno navedeno, heterozigotima za mutaciju kod kojih je jedan alel divlji a drugi mutirani, obje reporter boje daju signal, dok kod homozigota signal daje samo reporter boja kojom je označena proba za mutirani gen. Fluorescencija svakog uzorka na kraju umnažanja smješta se u graf s osi x (intenzitet fluorescencije FAM boje) i osi y (intenzitet fluorescencije VIC boje). Graf pruža pregledan prikaz tri moguća genotipa određene mutacije.

Ishodnice i probe za MTHFR C677T mutaciju sadržane su u komercijalnom kitu TaqMan SNP MTO Human, Assay ID C__1202883_20 (*Thermo Fisher Scientific, SAD*). Ishodnice i probe za MTHFR A1298C mutaciju sadržane su u komercijalnom kitu TaqMan SNP MTHFR polimorfizam 4351379, Assay ID C__850486_20 (*Thermo Fisher Scientific, SAD*). Ishodnice i probe za određivanje polimorfizma PAI-1 (4G/5G) sadržane su u komercijalnom kitu CUST TQMN SNP ASSAY HUMAN, assay ID AHQJIGG (*Thermo Fisher Scientific, SAD*).

4.2.2. Deaktivacija aktivnosti proteina C

Reagensi za detekciju aktivnosti proteina C i antitrombina

Za detekciju aktivnosti proteina C koristi se test naziva Berichrom Protein C. Berichrom Protein C služi za kvantitativno određivanje funkcionalno aktivnog proteina C korištenjem kromogenskog supstrata kao pomoć u dijagnozi nasljednih i stečenih nedostataka. Berichrom detektira amidolitički aktivni dio aktiviranog proteina C. U uzorku krvi za analizu, protein C aktivira se specifičnim zmijskim otrovom. Tako dobiveni protein C potom se analizira kinetičkim testom koji mjeri porast apsorpcije na 405nm prema sljedećoj formuli:

Protein C (uzorak) → aktivator proteina C → Protein C (aktivni)

p-Glu-Pro-Arg-MNA → Protein C (aktivni) → p-Glu-Pro-Arg-OH + MNA

Za dobivanje plazme potrebno je pažljivo pomiješati jedan dio (0,11mol/L) otopine natrijevog-citrata s devet dijelova venske krvi, izbjegavajući pritom stvaranje pjene. Uzorak je odmah potrebno centrifugirati na 1500 okretaja kroz 15 minuta na sobnoj temperaturi.

Postupci za ručno pipetiranje provode se prema shemi napisanoj u uputama Berichrom Protein C testa ovisno o vrsti metode (kinetička metoda u usporedbi s metodom two-point).

Ograničavajući faktori postupka su lažno pozitivni rezultati koji se mogu javiti kod osoba liječenih aprotininom. Rezultati testa trebaju se tumačiti u skladu s osobnom anamnezom i kliničkom slikom pacijenta.

Normalne vrijednosti proteina C kreću se između 70-140% od normalne razine. Očekivane vrijednosti zdravog pojedinca nisu uniformne za sve laboratorije, a koeficijent varijacije iznosi

0,4%. Koeficijent korelacije Berichrom Proteina C testa s imunokemijskim i drugim kromogenim metodama iznosi 0,74- 0,90.

4.2.3. Deaktivacija aktivnosti antitrombina

Berichrom Antitrombin III (A) koristi automatiziranu analizu za određivanje funkcionalne aktivnosti antitrombina u plazmi, a koristi se za dijagnosticiranje smanjene produkcije ili povećane potrošnje AT-a. U uzorku krvi AT se dodavanjem heparina pretvara u direktni inhibitor i inaktivira prisutni trombin. Količina preostalog trombina određuje se kinetičkim testom koji mjeri porast u apsorpciji na 405nm prema sljedećoj formuli:

ATIII (uzorak)+ Trombin (višak)→heparin→ [AT III- Trombin] + Trombin (višak)

Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA→rezidualni trombin→ Tos-Gly-Pro-Arg-OH + ANBA-IPA

Promjena apsorpcije obrnuto je proporcionalna aktivnosti antitrombina u uzorku.

Za dobivanje plazme potrebno je pažljivo pomiješati jedan dio (0,11mol/L) otopine natrijevog-citrata s devet dijelova venske krvi, izbjegavajući pritom stvaranje pjene. Uzorak je odmah potrebno centrifugirati na 1500 okretaja kroz 15 minuta na sobnoj temperaturi.

Postupci za ručno pipetiranje provode se prema shemi napisanoj u uputama Berichrom Antitrombin III (A) testa. Analiza se vrši automatski u koagulacijskom analizatoru. Ograničavajući faktori postupka su lažno negativni rezultati koji se mogu javiti kod osoba liječenih hirudinom ili drugim inhibitorom trombina. trebaju se tumačiti u skladu s osobnom anamnezom i kliničkom slikom pacijenta.

Mjerni raspon antitrombina kreće se između 0-140% od normalne razine. Granica detekcije iznosi oko 3,7%.

4.2.4. Detekcija aktivnosti proteina S

Protein S u plazmi se nalazi u slobodnom, koagulacijski aktivnom obliku i inaktivnom obliku koji je vezan za C4b vezni protein (C4BP). Za određivanje slobodnog i vezanog proteina S najpouzdanije su imunokemijske metode. Test pod nazivom Symex CA-1500 mjeri funkcionalno aktivni protein S. Princip rada testa bazira se na fiziološkim procesima. U uzorku krvi za analizu koagulacijski faktor V aktivira se specifičnim zmijskim otrovom (*Vipera russeli*). Nakupljanje aktivnog FV-a uzrokuje aktivaciju proteina C koji inhibira FV što potom uzrokuje pojačano stvaranje proteina S koji kao kofaktor PC-a ubrzava reakciju. Koagulacijsko vrijeme u uzorku raste proporcionalno s aktivnošću proteina S. Dodatak laboratorijski obrađene protein S deficitentne plazme osigurava dovoljnu količinu fibrinogena, FV-a i drugih potrebnih koagulacijskih faktora u uzorku. Koagulacija je potaknuta na razini FX-a koji se aktivira dodatkom zmijskog otrova VR. Potom aktivirani FX uz pomoć FV-a

pretvara protrombin u trombin koji potom pretvara fibrinogen u fibrin. Vrijeme koagulacije može se mjeriti mehanički, optički ili na neki drugi mjerni način. Aktivnost proteina S određuje se na automatiziranim koagulacijskim analizatorima.

Za dobivanje plazme potrebno je pažljivo pomiješati jedan dio (0,11mol/L) otopine natrijevog-citrata s devet dijelova venske krvi, izbjegavajući pritom stvaranje pjene. Uzorak je odmah potrebno centrifugirati na 1500 okretaja kroz 15 minuta na sobnoj temperaturi. Postupci za ručno pipetiranje provode se prema shemi napisanoj u uputama Symex CA-1500 testa. Rezultati se tumače uz pomoć referentne krivulje koja se prethodno odredi serijskim razrjeđivanjem standardne ljudske plazme s protein S deficijentnom plazmom.

Rezultati testa trebaju se tumačiti u skladu s osobnom anamnezom i kliničkom slikom pacijenta. Referentne vrijednosti proteina S variraju od laboratorija do laboratorija ovisno koju tehniku određeni laboratorij koristi tako da bi svaki laboratorij trebao odrediti svoj referentni interval. Koristeći Symex CA-1500 test, normalne vrijednosti proteina S kreću se između 10-130% od normalne razine, a koeficijent varijacije iznosi od 4,6% do 5,5%.

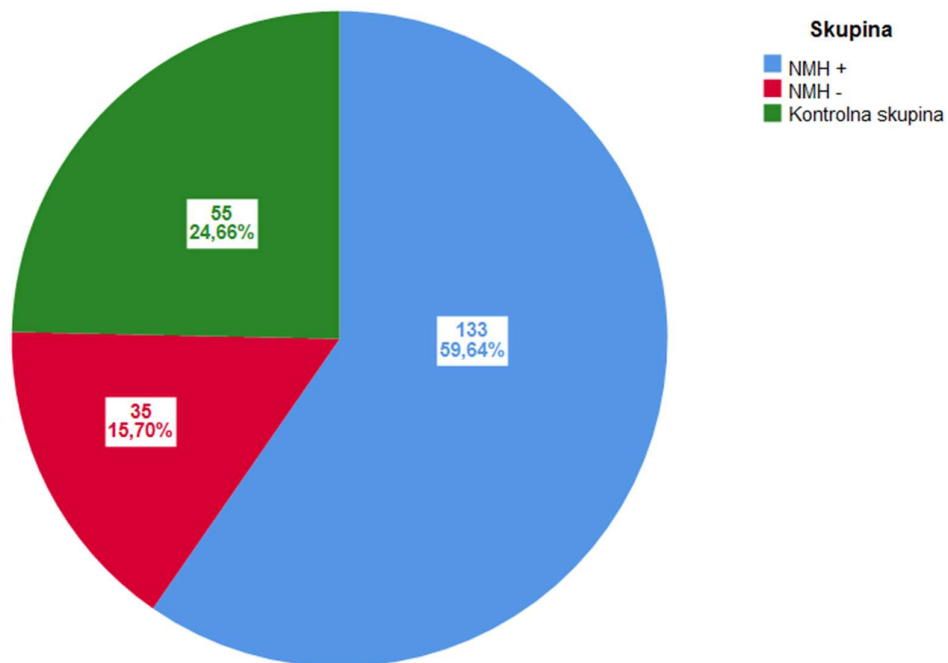
4.3. STATISTIČKA ANALIZA

Podaci su prikazani tablično i grafički. Kolmogorov-Smirnovljev testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Kategorijske i nominalne vrijednosti prikazane su kroz odgovarajuće frekvencije i udjele. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspone (s obzirom na neparametrijsku raspodjelu i veličinu uzorka). Razlike u kontinuiranim vrijednostima analizirane su Kruskal-Wallisovim testom uz odgovarajuće post-hoc testove Mann-Whitney U testom. Razlike u ponavljanim mjerenjima (razina trombocita prije i tijekom profilakse heparinom) analizirane su Wilcoxonovim testom i prikazane Box i Whiskerovim plotom.

Razlike u kategorijskim varijablama analizirane su Fisherovim egzaktnim testom za tablice veličine 2x2, odnosno Fisher-Freeman-Halton egzaktnim testom u slučaju većeg broja kombinacija. Dodatno su načinjeni omjeri vjerojatnosti (odds ratio) s odgovarajućim 95% intervalima pouzdanosti (95% *confidence interval* ili CI).

Sve P vrijednosti manje od 0,05 smatrane su značajnima. U analizi i grafičkim prikazima koristila se programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 (www.spss.com).

5. REZULTATI



Slika 8. Raspodjela ispitanica u kohortne skupine: heparin su primale 133 (59,64%) ispitanice (NMH+), bez profilakse heparinom bilo ih je 35 (15,70%) (NMH-), a kontrolna je skupina obuhvaćala 55 (24,66%) ispitanica.

Tablica 1. Demografija (opis kohortnih skupina) i razlike između ispitivanih skupina u kontinuiranim vrijednostima: Kruskal-Wallisov test

Skupina		N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
DOB TRUDNICE	NMH +	133	20,0	37,0	31,0	34,0	36,0	0,001
	NMH -	35	24,0	37,0	33,0	34,0	35,0	
	Kontrolna skupina	55	19,0	36,0	30,0	32,0	34,0	
ITM (kg/m ²)	NMH +	133	17,0	49,0	24,0	27,0	30,0	<0,001
	NMH -	35	21,0	35,0	24,0	27,0	29,0	
	Kontrolna skupina	55	18,0	40,0	22,0	25,0	26,0	
BROJ TROMBOCITA PRIJE UVOĐENJA NMH	NMH +	115	71,0	400,0	230,0	257,0	300,0	0,048
	NMH -	33	137,0	337,0	204,0	233,0	283,5	
	Kontrolna skupina	53	139,0	345,0	201,0	234,0	311,0	
BROJ TROMBOCITA ZA VRIJEME NMH PROFILAKSE	NMH +	132	33,0	405,0	177,3	215,5	255,8	NA
	NMH -	0						
	Kontrolna skupina	0						
TJEDAN POROĐAJA NUMERIČKI	NMH +	133	0,0	41,0	38,0	39,0	40,0	0,403
	NMH -	35	0,0	41,0	35,0	39,0	40,0	
	Kontrolna skupina	55	37,0	42,0	38,0	39,0	40,0	
TJELESNA TEŽINA NEONATUSA	NMH +	130	930,0	4500,0	3147,5	3435,0	3752,5	0,588
	NMH -	29	2110,0	4160,0	3105,0	3410,0	3555,0	
	Kontrolna skupina	55	2600,0	4370,0	3150,0	3350,0	3780,0	
APGAR PRVA MINUTA	NMH +	130	2,0	10,0	10,0	10,0	10,0	0,052
	NMH -	29	8,0	10,0	10,0	10,0	10,0	
	Kontrolna skupina	55	5,0	10,0	10,0	10,0	10,0	
APGAR PETA MINUTA	NMH +	130	4,0	10,0	10,0	10,0	10,0	0,248
	NMH -	29	9,0	10,0	10,0	10,0	10,0	
	Kontrolna skupina	55	8,0	10,0	10,0	10,0	10,0	

Tablica 2. Post-hoc analiza značajnih razlika iz Tablice 1: Mann-Whitney U test

Razlike između grupa P vrijednosti: Mann-Whitney U test	NMH + vs NMH -	NMH + vs Kontrolna sk.	NMH - vs Kontrolna sk.
Dob	0,744	0,001	0,005
ITM	0,710	<0,001	0,001
Broj trombocita prije NMH	0,043	0,057	0,752

Razlike između ispitivanih skupina u kontinuiranim demografskim i kliničkim vrijednostima prikazane su u Tablici 1. Prisutne su značajne razlike u dobi ($P=0,001$; ispitivane skupine u odnosu na kontrolnu skupinu bile su značajno starije), indeksu tjelesne mase ($P<0,001$; ispitivane skupine u odnosu na kontrolnu skupinu imale su značajno veći indeks tjelesne mase) te u broju trombocita prije uvođenja NMH (NMH+ skupina imala je značajno veće vrijednosti broja trombocita u odnosu na NMH- skupinu, $P=0,043$). Post-hoc analiza značajnih razlika iz Tablice 1. prikazana je u Tablici 2. te je u tablici prikazano između kojih dviju skupina postoji značajna razlika.

Tablica 3. Razlike između ispitivanih kategorijskih varijabli između ispitivanih i kontrolne skupine: Fisher-Freeman-Haltonov test

		Skupina						P
		NMH +		NMH -		Kontrolna skupina		
		N	%	N	%	N	%	
Prethodni porođaj	Nulipara	73	54,9%	19	54,3%	34	61,8%	0,513
	Multipara	24	18,0%	3	8,6%	8	14,5%	
	Primipara	36	27,1%	13	37,1%	13	23,6%	
BROJ POBAČAJA*	Nije bilo pobačaja	0	0,0%	0	0,0%			0,233
	2	77	57,9%	26	74,3%			
	3	38	28,6%	6	17,1%			
	>3	18	13,5%	3	8,6%			
pH UMBILIKALNE ARTERIJE*	Nije rađen	96	72,2%	25	71,4%			0,301
	Uredan (7,25-7,35)	25	18,8%	10	28,6%			
	Preacidoza (7,20-7,25)	6	4,5%	0	0,0%			
	Acidoza (<7,20)	6	4,5%	0	0,0%			

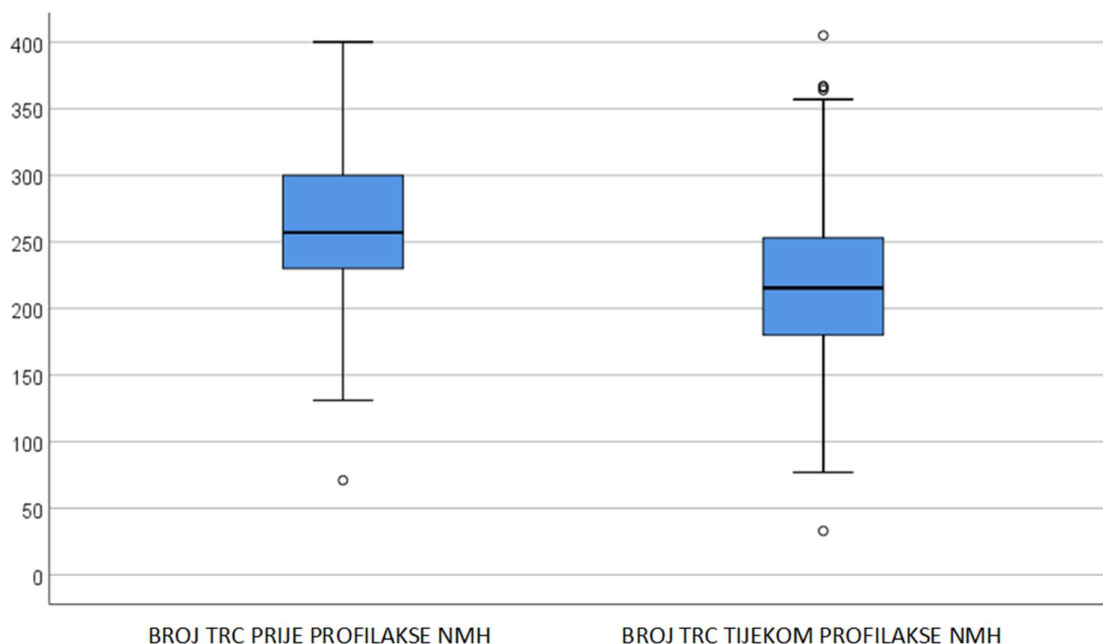
*Usporedbe samo NMH + vs NMH -

Razlike između ispitivanih kategorijskih varijabli između ispitivanih i kontrolne skupine prikazane su u Tablici 3. Nije bilo značajnih razlika u broju prethodnih porođaja, broju pobačaja, kao ni u pH vrijednosti krvi iz umbilikalne arterije.

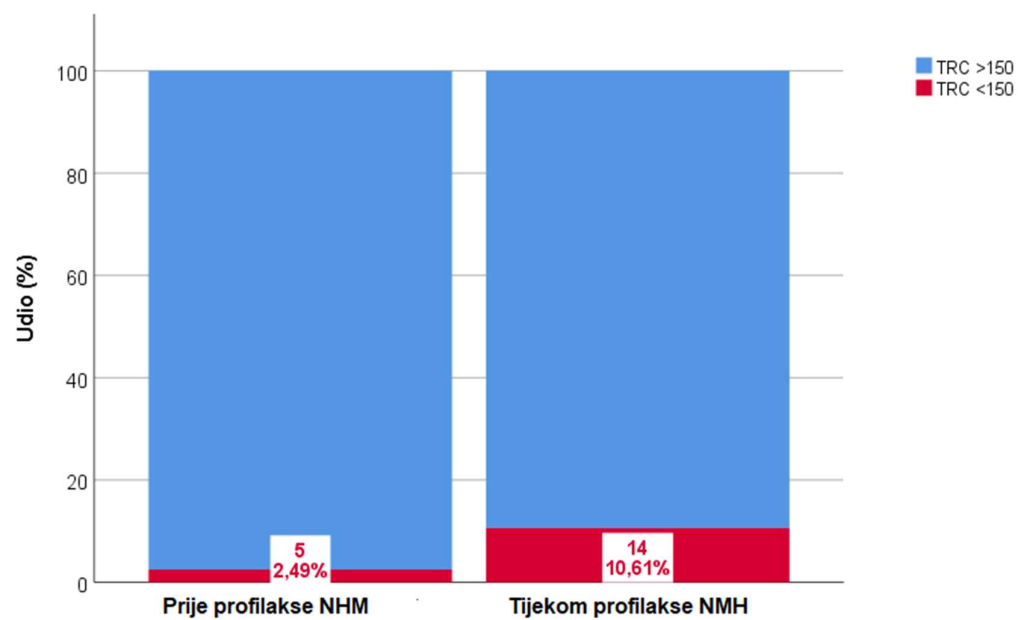
Tablica 4. Razlike u broju trombocita kod praćenih ispitanica prije i poslije uvođenja NMH profilakse: Wilcoxonov test (odnosi se na broj ispitanica koje su uzimale heparinsku profilaksu te podatke o broju trombocita prije i tijekom profilakse N=114)

	N	Min	Max	Centile			P
				25.	Medijan	75.	
BROJ TROMBOCITA PRIJE UVOĐENJA NMH	114	71	400	230,00	257,00	300,00	<0,001
BROJ TROMBOCITA ZA VRIJEME NMH PROFILAKSE	114	33	405	177,25	215,50	255,75	

Razlike u broju trombocita kod praćenih ispitanica prije i tijekom profilakse heparinom u NMH+ skupini prikazane su u Tablici 4. te na Slici 9. Očit je značajan pad broja trombocita s 257,0 (230,0-300,0) na 215,5 (177,3-255,8), $P<0,001$.



Slika 9. Razlike u broju trombocita kod praćenih ispitanica prije i tijekom NMH profilakse: Wilcoxonov test, $P<0,001$



Slika 9a. Promjena broja trombocita (≤ 150 ili ≥ 150) prije i tijekom NMH profilakse;
 $P=0,003$

Tablica 5. Razlike između ispitivanih kliničkih kategorijskih varijabli između ispitivanih i kontrolne skupine: Fisher-Freeman-Haltonov test

		Skupina						P
		NMH+		NMH-		Kontrolna skupina		
		N	%	N	%	N	%	
OBITELJSKA ANAMNEZA	Bez tromboembolijskih incidenata u obitelji	99	74,40%	30	85,70%	45	81,80%	0,287
	Pozitivna na tromboembolijske incidente (CVI, IM, DVT)	34	25,60%	5	14,30%	10	18,20%	
OSOBN ANAMNEZA*	Bez tromboembolijskih incidenata u osobnoj anamnezi	130	97,70%	35	100,00%			1
	Tromboembolijski incidenti u osobnoj anamnezi (CVI, DVT)	3	2,30%	0	0,00%			
HABITUALNI POBAČAJI*	Nije bilo pobačaja	0	0,00%	0	0,00%			0,528
	Zadržani pobačaji <12 tjedna	119	89,50%	33	94,30%			
	Zadržani pobačaji 12-22 tjedna	14	10,50%	2	5,70%			
KOMPLIKACIJE PRETHODNIH TRUDNOĆA*	Uredna trudnoća	58	43,60%	15	44,10%			0,878
	Gestacijska hipertenzija	2	1,50%	1	2,90%			
	Preeklampsija	1	0,80%	0	0,00%			
	Abrupcija posteljice	0	0,00%	0	0,00%			
	HELLP sindrom	1	0,80%	0	0,00%			
	Nije bilo porođaja	71	53,40%	18	52,90%			
PATOLOGIJA FETUSA U PRETHODNIM TRUDNOĆAMA*	Nje bilo porođaja	73	54,89%	19	54,29%			0,872
	Uredan	53	39,85%	15	42,86%			
	Fetalna smrt	4	3,01%	0	0,00%			
	Intrauterini zastoj rasta	3	2,26%	1	2,86%			
PATOLOGIJA TRUDNOĆE	Uredna trudnoća	120	90,20%	28	80,00%	53	96,40%	0,126
	Gestacijska hipertenzija	11	8,30%	7	20,00%	2	3,60%	
	Abrupcija posteljice	1	0,80%	0	0,00%	0	0,00%	
	Preeklampsija	1	0,80%	0	0,00%	0	0,00%	
	HELLP sindrom	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	
PATOLOGIJA FETUSA*	Bez patologije	125	94,00%	34	97,10%			1
	Intrauterini zastoj rasta	8	6,00%	1	2,90%			
	Fetalna smrt	0	0,00%	0	0,00%			

*Usporedbe samo NMH+ vs NMH–

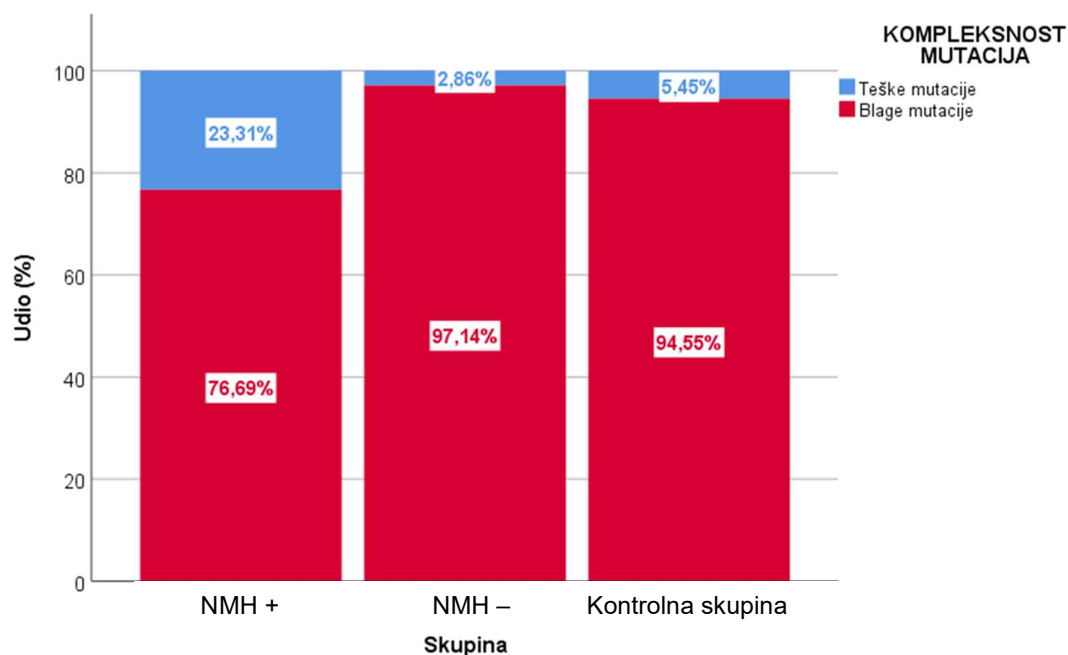
Razlike između ispitivanih kliničkih kategorijskih varijabli između ispitivanih i kontrolne skupine prikazane su u Tablici 5. Nije bilo statistički značajnih razlika.

Tablica 6. Razlike između kliničkih ispitivanih kategorijskih varijabli između ispitivanih kontrolnih skupina: Fisher-Freeman-Haltonov test (nastavak)

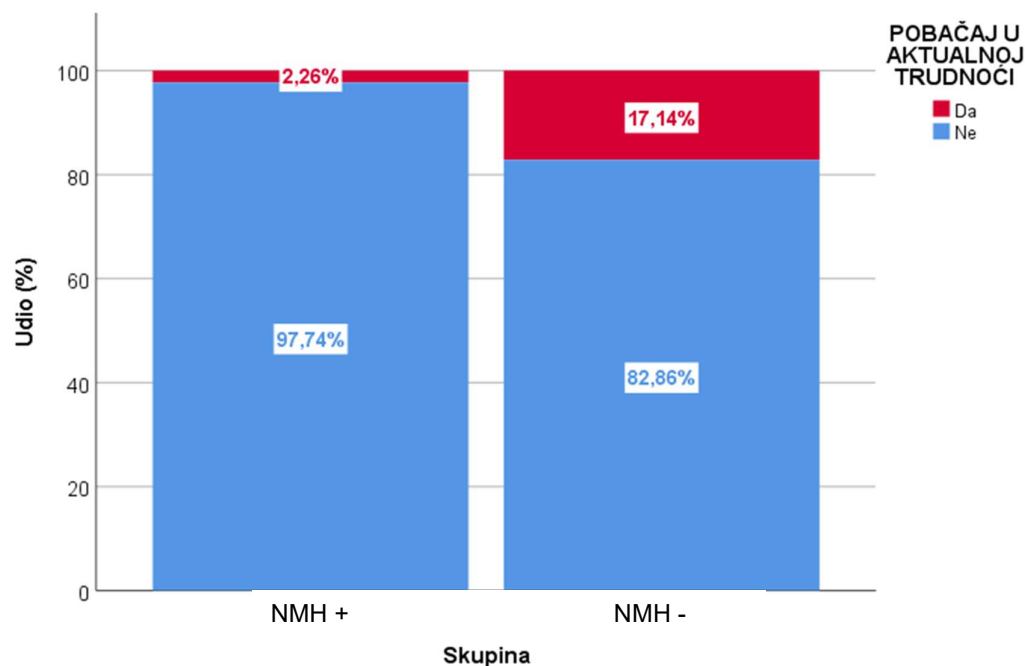
		Skupina						P
		NMH+		NMH-		Kontrolna skupina		
		N	%	N	%	N	%	
KOMPLEKSNOŠT MUTACIJA	„Teške“ mutacije (FVL, FII, def. PS, def PC)	31	23,3%	1	2,9%	3	5,5%	<0,001
	„Blage“ mutacije (PAI1, MTHFR)	102	76,7%	34	97,1%	52	94,5%	
VRSTA TEŠKE TROMBOFILIJE	FVL	18	58,1%	0	0,0%	1	33,3%	0,224
	FII	9	29,0%	0	0,0%	1	33,3%	
	Deficijencija PS-a	3	9,7%	1	100,0%	1	33,3%	
	Deficijencija PC-a	1	3,2%	0	0,0%	0	0,0%	
VRSTA BLAGE TROMBOFILIJE	MTHFR	11	10,8%	7	20,6%	13	25,0%	0,122
	PAI-1	32	31,4%	13	38,2%	16	30,8%	
	MTHFR+PAI-1	59	57,8%	14	41,2%	23	44,2%	
TJEDAN POROĐAJA	22-28	1	0,8%	0	0,0%	0	0,0%	0,327
	28-34	5	3,8%	2	6,9%	0	0,0%	
	34-37	2	1,5%	1	3,4%	0	0,0%	
	37-42	122	93,8%	26	89,7%	55	100,0%	
POBAČAJ U AKTUALNOJ TRUDNOĆI*	Da	3	2,3%	6	17,1%			0,001
	Ne	130	97,7%	29	82,9%			
NAČIN POROĐAJA	Vaginalni porod	80	61,5%	17	58,6%	40	72,7%	0,266
	Sc	50	38,5%	12	41,4%	15	27,3%	
RANI NEONATALNI ISHOD	Nije bilo poroda (pobačaj, fetalna smrt)	3	2,3%	6	17,1%	0	0,0%	0,002
	Uredan neonatalni ishod	120	90,2%	27	77,1%	54	98,2%	
	Neonatalna patologija kao posljedica insuficijencije posteljice (zastoj rasta, asfiksija kod poroda)	10	7,5%	2	5,7%	1	1,8%	
KOMPLIKACIJE U RANOM BABINJU	Bez tromboembolijskih incidenata	133	100,0%	35	100,0%	55	100,0%	NA
	Pozitivan na tromboembolijske incidente (CVI, IM, DVT)	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	

*Usporedbe samo NMH+ vs NMH–

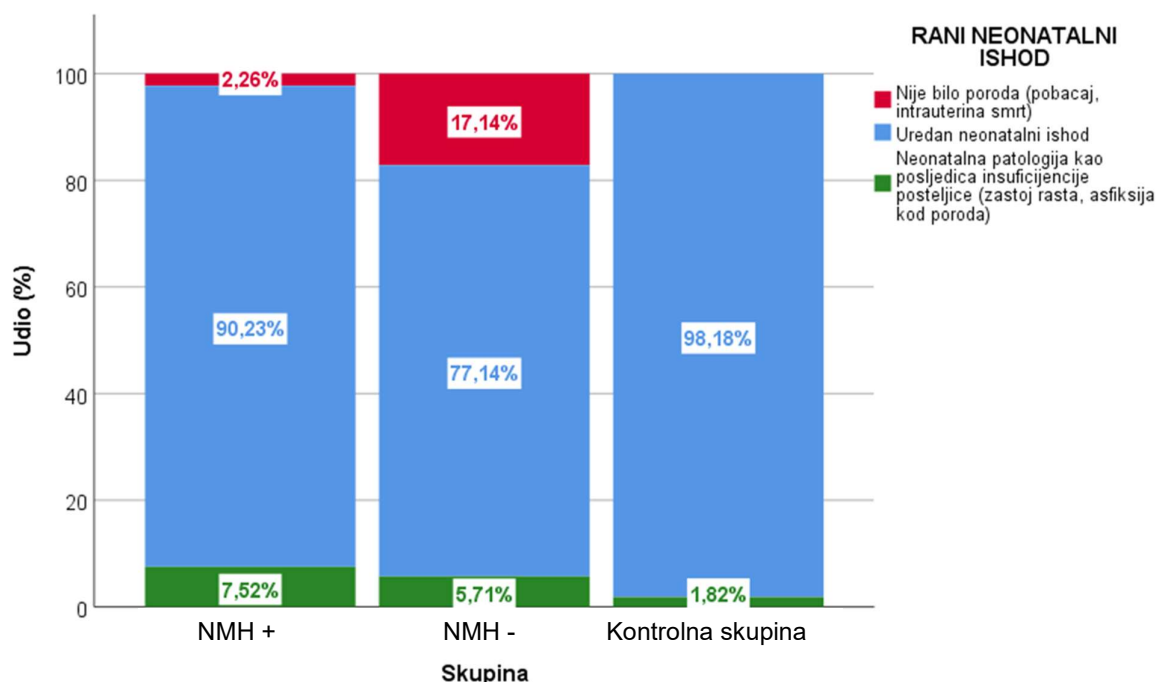
Iz Tablice 6. očita je značajna razlika u učestalosti „teških“ mutacija (značajno češće u NMH+ skupini u odnosu na kontrolnu skupinu $P=0,018$ te na NMH- skupinu, $P=0,011$; Slika 10). NMH- skupina imala je značajno veći udio spontanih pobačaja u aktualnoj trudnoći u odnosu na NMH+ skupinu (17,1% u odnosu na 2,3%; $P=0,001$; Slika 11). NMH- skupina imala je značajno manji broj urednih neonatalnih ishoda u odnosu na NMH+ skupinu (17,1% u odnosu na 2,3%; $P=0,001$; Slika 12).



Slika 10. Vrste mutacija za nasljednu trombofiliju u ispitivanim skupinama, „teške“ (uključuje: FVL, PGM, deficijenciju PC i PS) vs „blage“ (uključuje: mutaciju MTHFR gena, mutaciju PAI-1 gena); $P < 0,001$



Slika 11. Pobačaj kao ishod aktualne trudnoće u NMH+ i NMH- skupini ispitanica; $P = 0,001$



Slika 12. Rani neonatalni ishod u tri skupine ispitanica, NMH+, NMH- i kontrolna skupina:

$P=0,002$

Razlike u kompleksnosti mutacija između pojedinih kliničkih kategorijskih varijabli u skupini bolesnica (NMH+ i NMH-) prikazane su u Tablici 7. U skupini „teških“ mutacija u prethodnim trudnoćama značajno je više bilo gestacijskih hipertenzija te preeklampsija ($P=0,039$).

Tablica 8. prikazuje razlike u kompleksnosti mutacija između pojedinih kliničkih kategorijskih varijabli u NMH+ skupini. U skupini „teških“ mutacija, analizom patologije prethodnih trudnoća, pronađeno je značajno više gestacijskih hipertenzija te preeklampsija ($P=0,024$).

Razlike u kompleksnosti mutacija između pojedinih kliničkih kategorijskih varijabli u NMH- skupini prikazane su u Tablici 9. U skupini s „blagim“ mutacijama značajno je češći bio uredan nalaz ishoda prethodnih trudnoća ($P=0,029$).

Razlike u kompleksnosti mutacija između pojedinih kliničkih kategorijskih varijabli u kontrolnoj skupini prikazane su u Tablici 10. Nije bilo značajnih razlika.

Tablica 7. Razlike u kompleksnosti mutacija između pojedinih kliničkih kategorijskih varijabli u skupini bolesnica (NMH + i NMH -): Fisher-Freeman-Haltonov test

NMH + i NMH -		KOMPLEKSNOST MUTACIJA				P
		„Teške“ mutacije (FVL, FII, def. PS, def. PC)		„Blage“ mutacije (PAI1, MTHFR)		
		N	%	N	%	
HABITUALNI POBAČAJI	Nije bilo pobačaja	0	0,00%	0	0,00%	0,192
	Zadržani pobačaji <12 tjedna	27	84,40%	125	91,90%	
	Zadržani pobačaji 12-22 tjedna	5	15,60%	11	8,10%	
FETALNA SMRT U PRETHODNIM TRUDNOĆAMA	NE	31	96,90%	133	97,80%	1,000
	DA	1	3,10%	3	2,20%	
KOMPLIKACIJE PRETHODNIH TRUDNOĆA	Uredna trudnoća	16	50,00%	57	42,20%	0,039
	Gestacijska hipertenzija	2	6,30%	1	0,70%	
	Preeklampsija	1	3,10%	0	0,00%	
	Abrupcija posteljice	0	0,00%	0	0,00%	
	HELLP sindrom	0	0,00%	1	0,70%	
	Nije bilo porođaja	13	40,60%	76	56,30%	
PATOLOGIJA FETUSA U PRETHODNIM TRUDNOĆAMA	Nije bilo porođaja	13	40,63%	79	58,09%	0,022
	Uredan	15	46,88%	53	38,97%	
	Fetalna smrt	1	3,13%	3	2,21%	
	Intrauterini zastoj rasta	3	9,38%	1	0,74%	
PATOLOGIJA TRUDNOĆE	Uredna trudnoća	29	90,60%	119	87,50%	0,233
	Gestacijska hipertenzija	2	6,30%	16	11,80%	
	Abrupcija posteljice	0	0,00%	1	0,70%	
	Preeklampsija	1	3,10%	0	0,00%	
	HELLP sindrom	0	0,00%	0	0,00%	
PATOLOGIJA FETUSA	Bez patologije	30	93,80%	129	94,90%	0,681
	Intrauterini zastoj rasta	2	6,30%	7	5,10%	
	Intrauterina smrt ploda	0	0,00%	0	0,00%	
TJEDAN POROĐAJA	22-28	0	0,00%	1	0,80%	0,304
	28-34	3	9,40%	4	3,10%	
	34-37	1	3,10%	2	1,60%	
	37-42	28	87,50%	120	94,50%	
POBAČAJ U AKTUALNOJ TRUDNOĆI	Da	0	0,00%	9	6,60%	0,210
	Ne	32	100,00%	127	93,40%	
NAČIN POROĐAJA	Vaginalni porod	19	59,40%	78	61,40%	0,842
	Sc	13	40,60%	49	38,60%	
RANI NEONATALNI ISHOD	Nije bilo poroda (pobačaj, fetalna smrt)	0	0,00%	9	6,60%	0,479
	Uredan neonatalni ishod	30	93,80%	117	86,00%	
	Neonatalna patologija kao posljedica insuficijencije posteljice	2	6,30%	10	7,40%	
KOMPLIKACIJE U BABINJU	Bez tromboembolijskih incidenata	32	100,00%	136	100,00%	NA
	Pozitivan na tromboembolijske incidente (CVI, IM, DVT)	0	0,00%	0	0,00%	

Tablica 8. Razlike u kompleksnosti mutacija između pojedinih kliničkih kategorijskih varijabli u NMH+ skupini ispitanica: Fisher-Freeman-Haltonov test

NMH +		KOMPLEKSNOST MUTACIJA				P
		„Teške“ mutacije (FVL, FII, def. PS, def. PC)		„Blage“ mutacije (PAI1, MTHFR)		
		N	%	N	%	
HABITUALNI POBAČAJI	Nije bilo pobačaja	0	0,00%	0	0,00%	0,314
	Zadržani pobačaji <12 tjedna	26	83,90%	93	91,20%	
	Zadržani pobačaji 12-22 tjedna	5	16,10%	9	8,80%	
FETALNA SMRT U PRETHODNIM TRUDNOĆAMA	Ne	30	96,80%	99	97,10%	1
	Da	1	3,20%	3	2,90%	
KOMPLIKACIJE PRETHODNIH TRUDNOĆA	Uredna trudnoća	15	48,40%	43	42,20%	0,024
	Gestacijska hipertenzija	2	6,50%	0	0,00%	
	Preeklampsija	1	3,20%	0	0,00%	
	Abrupcija posteljice	0	0,00%	0	0,00%	
	HELLP sindrom	0	0,00%	1	1,00%	
	Nije bilo porođaja	13	41,90%	58	56,90%	
PATOLOGIJA FETUSA U PRETHODNIM TRUDNOĆAMA	Nije bilo porođaja	13	41,94%	60	58,82%	0,125
	Uredan	15	48,39%	38	37,25%	
	Fetalna smrt	1	3,23%	3	2,94%	
	Intrauterini zastoj rasta	2	6,45%	1	0,98%	
PATOLOGIJA TRUDNOĆE	Uredna trudnoća	28	90,30%	92	90,20%	0,489
	Gestacijska hipertenzija	2	6,50%	9	8,80%	
	Abrupcija posteljice	0	0,00%	1	1,00%	
	Preeklampsija	1	3,20%	0	0,00%	
	HELLP sindrom	0	0,00%	0	0,00%	
PATOLOGIJA FETUSA	Bez patologije	29	93,50%	96	94,10%	1
	Intrauterini zastoj rasta	2	6,50%	6	5,90%	
	Fetalna smrt	0	0,00%	0	0,00%	
TJEDAN POROĐAJA	22-28	0	0,00%	1	1,00%	0,417
	28-34	2	6,50%	3	3,00%	
	34-37	1	3,20%	1	1,00%	
	37-42	28	90,30%	94	94,90%	
POBAČAJ U AKTUALNOJ TRUDNOĆI	Da	0	0,00%	3	2,90%	1
	Ne	31	100,00%	99	97,10%	
NAČIN POROĐAJA	Vaginalni porod	19	61,30%	61	61,60%	1
	Sc	12	38,70%	38	38,40%	
RANI NEONATALNI ISHOD	Nije bilo poroda (pobačaj, intrauterina smrt)	0	0,00%	3	2,90%	1
	Uredan neonatalni ishod	29	93,50%	91	89,20%	
	Neonatalna patologija kao posljedica insuficijencije posteljice	2	6,50%	8	7,80%	
KOMPLIKACIJE U BABINJU	Bez tromboembolijskih incidenata	31	100,00%	102	100,00%	NA
	Pozitivan na tromboembolijske incidente (CVI, IM, DVT)	0	0,00%	0	0,00%	

Tablica 9. Razlike u kompleksnosti mutacija između pojedinih kliničkih kategorijskih varijabli u NMH- skupini ispitanica: Fisher-Freeman-Haltonov test

NMH -		KOMPLEKSNOST MUTACIJA				P
		„Teške“ mutacije (FVL, FII, def. PS, def. PC)		„Blage“ mutacije (PAI1, MTHFR)		
		N	%	N	%	
HABITUALNI POBAČAJI	Nije bilo pobačaja	0	0,00%	0	0,00%	1
	Zadržani pobačaji <12 tjedna	1	100,00%	32	94,10%	
	Zadržani pobačaji 12-22 tjedna	0	0,00%	2	5,90%	
FETALNA SMRT U PRETHODNIM TRUDNOĆAMA	Ne	1	100,00%	34	100,00%	NA
	Da	0	0,00%	0	0,00%	
KOMPLIKACIJE PRETHODNIH TRUDNOĆA	Uredna trudnoća	1	100,00%	14	42,40%	0,471
	Gestacijska hipertenzija	0	0,00%	1	3,00%	
	Preeklampsija	0	0,00%	0	0,00%	
	Abrupcija posteljice	0	0,00%	0	0,00%	
	HELLP sindrom	0	0,00%	0	0,00%	
	Nije bilo porođaja	0	0,00%	18	54,50%	
PATOLOGIJA FETUSA U PRETHODNIM TRUDNOĆAMA	Nije bilo porođaja	0	0,00%	19	55,88%	0,029
	Uredan	0	0,00%	15	44,12%	
	Fetalna smrt	0	0,00%	0	0,00%	
	Intrauterini zastoj rasta	1	100,00%	0	0,00%	
PATOLOGIJA TRUDNOĆE	Uredna trudnoća	1	100,00%	27	79,40%	1
	Gestacijska hipertenzija	0	0,00%	7	20,60%	
	Abrupcija posteljice	0	0,00%	0	0,00%	
	Preeklampsija	0	0,00%	0	0,00%	
	HELLP sindrom	0	0,00%	0	0,00%	
PATOLOGIJA FETUSA	Bez patologije	1	100,00%	33	97,10%	1
	Intrauterini zastoj rasta	0	0,00%	1	2,90%	
	Fetalna smrt	0	0,00%	0	0,00%	
TJEDAN POROĐAJA	22-28	0	0,00%	0	0,00%	0,103
	28-34	1	100,00%	1	3,60%	
	34-37	0	0,00%	1	3,60%	
	37-42	0	0,00%	26	92,90%	
POBAČAJ U AKTUALNOJ TRUDNOĆI	Da	0	0,00%	6	17,60%	1
	Ne	1	100,00%	28	82,40%	
NAČIN POROĐAJA	Vaginalni porod	0	0,00%	17	60,70%	0,414
	Sc	1	100,00%	11	39,30%	
RANI NEONATALNI ISHOD	Nije bilo poroda (pobačaj, intrauterina smrt)	0	0,00%	6	17,60%	1
	Uredan neonatalni ishod	1	100,00%	26	76,50%	
	Neonatalna patologija kao posljedica insuficijencije posteljice	0	0,00%	2	5,90%	
KOMPLIKACIJE U BABINJU	Bez tromboembolijskih incidenata	1	100,00%	34	100,00%	NA
	Pozitivan na tromboembolijske incidente (CVI, IM, DVT)	0	0,00%	0	0,00%	

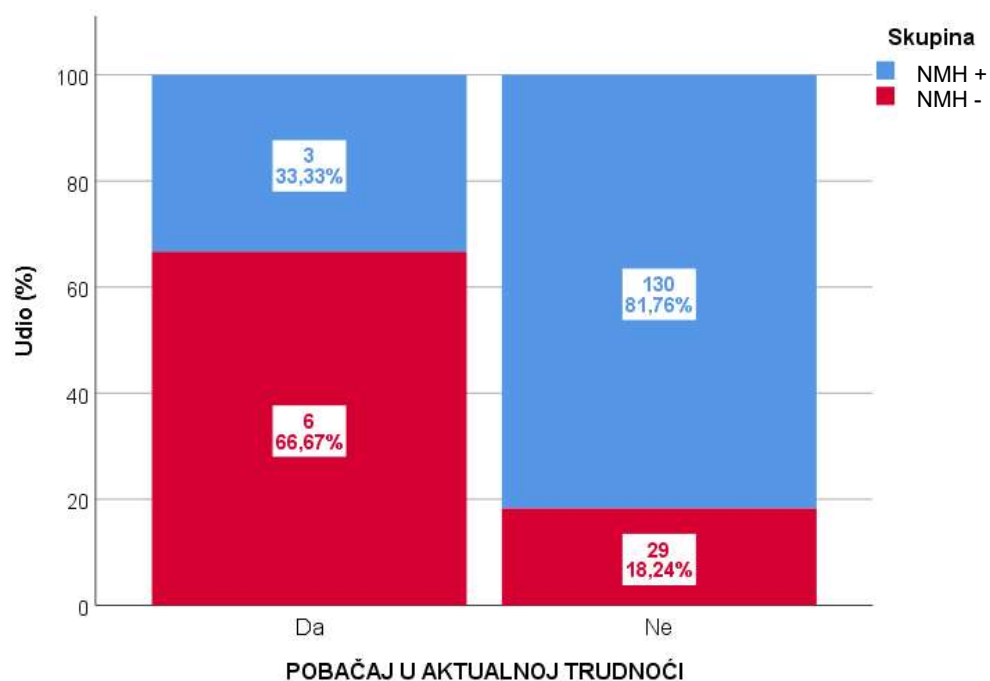
Tablica 10. Razlike u kompleksnosti mutacija između pojedinih kliničkih kategorijskih varijabli u kontrolnoj skupini: Fisher-Freeman-Haltonov test

Kontrola		KOMPLEKSNOST MUTACIJA				P
		„Teške“ mutacije (FVL, FII, def. PS, def. PC)		„Blage“ mutacije (PAI1, MTHFR)		
		N	%	N	%	
HABITUALNI POBAČAJI	Nije bilo pobačaja	3	100,00%	52	100,00%	NA
	Zadržani pobačaji <12 tjedna	0	0,00%	0	0,00%	
	Zadržani pobačaji 12-22 tjedna	0	0,00%	0	0,00%	
FETALNA SMRT U PRETHODNIM TRUDNOĆAMA	Ne	0	0,00%	0	0,00%	NA
	Da	0	0,00%	0	0,00%	
KOMPLIKACIJE PRETHODNIH TRUDNOĆA	Uredna trudnoća	0	0,00%	21	40,40%	0,279
	Gestacijska hipertenzija	0	0,00%	0	0,00%	
	Preeklampsija	0	0,00%	0	0,00%	
	Abrupcija posteljice	0	0,00%	0	0,00%	
	HELLP sindrom	0	0,00%	0	0,00%	
	Nije bilo porođaja	3	100,00%	31	59,60%	
ISHOD PRETHODNIH TRUDNOĆA	Nije bilo porođaja	3	100,00%	31	59,62%	0,279
	Uredan	0	0,00%	21	40,38%	
	Fetalna smrt	0	0,00%	0	0,00%	
	Intrauterini zastoj rasta	0	0,00%	0	0,00%	
PATOLOGIJA TRUDNOĆE	Uredna trudnoća	3	100,00%	50	96,20%	1
	Gestacijska hipertenzija	0	0,00%	2	3,80%	
	Abrupcija posteljice	0	0,00%	0	0,00%	
	Preeklampsija	0	0,00%	0	0,00%	
	HELLP sindrom	0	0,00%	0	0,00%	
PATOLOGIJA FETUSA	Bez patologije	3	100,00%	52	100,00%	NA
	Intrauterini zastoj rasta	0	0,00%	0	0,00%	
	Fetalna smrt	0	0,00%	0	0,00%	
TJEDAN POROĐAJA	22-28	0	0,00%	0	0,00%	NA
	28-34	0	0,00%	0	0,00%	
	34-37	0	0,00%	0	0,00%	
	37-42	3	100,00%	52	100,00%	
POBAČAJ U AKTUALNOJ TRUDNOĆI	Da	0	0,00%	0	0,00%	NA
	Ne	3	100,00%	52	100,00%	
NAČIN POROĐAJA	Vaginalni porod	2	66,70%	38	73,10%	1
	Sc	1	33,30%	14	26,90%	
RANI NEONATALNI ISHOD	Nije bilo poroda (pobačaj, intrauterina smrt)	0	0,00%	0	0,00%	1
	Uredan neonatalni ishod	3	100,00%	51	98,10%	
	Neonatalna patologija kao posljedica insuficijencije posteljice	0	0,00%	1	1,90%	
KOMPLIKACIJE U BABINJU	Bez tromboembolijskih incidenata	3	100,00%	52	100,00%	NA
	Pozitivan na tromboembolijske incidente (CVI, IM, DVT)	0	0,00%	0	0,00%	

Tablica 11. Utjecaj heparina na ishod trudnoće kod trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima

HABITUALNI POBAČAJI + NASLJEDNA TROMBOFILIJA	ISHOD TRUDNOĆE		
	POBAČAJ n (%)	POROĐAJ n (%)	UKUPNO n (%)
NMH+	3 (2,3)	130 (97,7)	133 (100)
NMH-	6 (17,1)	29 (82,9)	35 (100)
UKUPNO	9 (5,3)	159 (94,7)	168 (100)

OR	8,97
95% CI	2,11-37,96
P	0,003



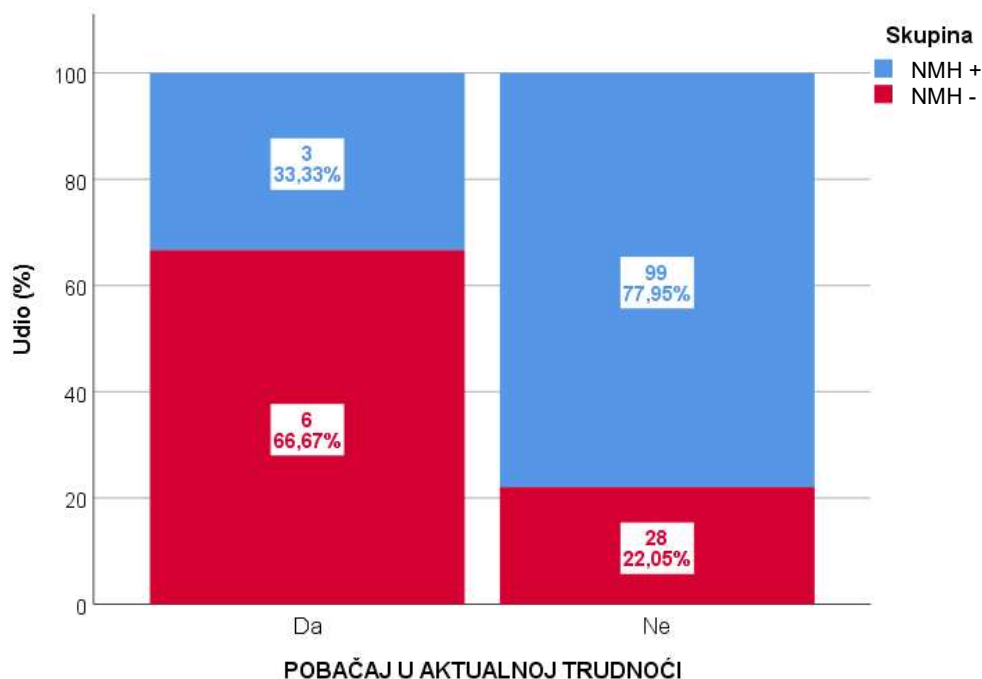
Slika 13. Utjecaj heparina na ishod trudnoće kod trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima

Utjecaj heparina na ishod trudnoće kod trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima prikazan je u Tablici 11. i na Slici 13. Ispitanice NMH+ skupine imale su 8,97 puta veću vjerojatnost urednog porođaja u odnosu na ispitanice NMH- skupine: OR=8,97, 95% CI=2,11-37,96, $P=0,003$.

Tablica 12. Utjecaj heparina na ishod trudnoće kod trudnica s habitualnim pobačajima i blagim mutacijama za nasljednu trombofiliju

HABITUALNI POBAČAJI + „BLAGE“ MUTACIJE ZA NASLJEDNU TROMBOFILIJU (PAI1, MTHFR, PAI1+MTHFR)	ISHOD TRUDNOĆE		
	POBAČAJ n (%)	POROĐAJ n (%)	UKUPNO n (%)
NMH+	3 (2,9)	99 (97,1)	102 (100)
NMH-	6 (17,6)	28 (82,4)	34 (100)
UKUPNO	9 (6,6)	127 (93,4)	136 (100)

OR	7,07
95% CI	1,66-30,09
P	0,008



Slika 14. Utjecaj heparina na ishod trudnoće kod trudnica s habitualnim pobačajima i „*blagim*“ mutacijama za nasljednu trombofiliju

Utjecaj heparina na ishod trudnoće kod trudnica s habitualnim pobačajima i „*blagim*“ mutacijama za nasljednu trombofiliju prikazan je u Tablici 12. i na Slici 14. U skupini s habitualnim pobačajima i „*blagim*“ mutacijama za nasljednu trombofiliju ispitanice koje su primale NMH profilaksu imale su 7,07 puta veću vjerojatnost urednog porođaja: OR=7,07, 95% CI=1,66-30,09, $P=0,008$.

Tablica 13. Utjecaj heparina na ishod trudnoće kod trudnica s habitualnim pobačajima i „teškim“ mutacijama za nasljednu trombofiliju

HABITUALNI POBAČAJI + „TEŠKE“ MUTACIJE ZA NASLJEDNU TROMBOFILIJU (FVL, FII, def PS, def PC)	ISHOD TRUDNOĆE		
	POBAČAJ n (%)	POROĐAJ n (%)	UKUPNO n (%)
NMH+	0 (0)	31 (100)	31 (100)
NMH-	0 (0)	1 (100)	1 (100)
UKUPNO	0 (0)	32 (100)	32 (100)

OR	21,00
95% CI	0,30-1469,94
<i>P</i>	0,160

Tablica 14. Ishod trudnoće u NMH+ skupini ispitanica u odnosu na kontrolnu skupinu

NASLJEDNA TROMBOFILIJA	ISHOD TRUDNOĆE		
	POBAČAJ n (%)	POROĐAJ n (%)	UKUPNO n (%)
NMH +	3 (2,3)	130 (97,7)	133 (100)
KONTROLNA SKUPINA	0 (0)	55 (100)	55 (100)
UKUPNO	3 (1,6)	185 (98,4)	188 (100)

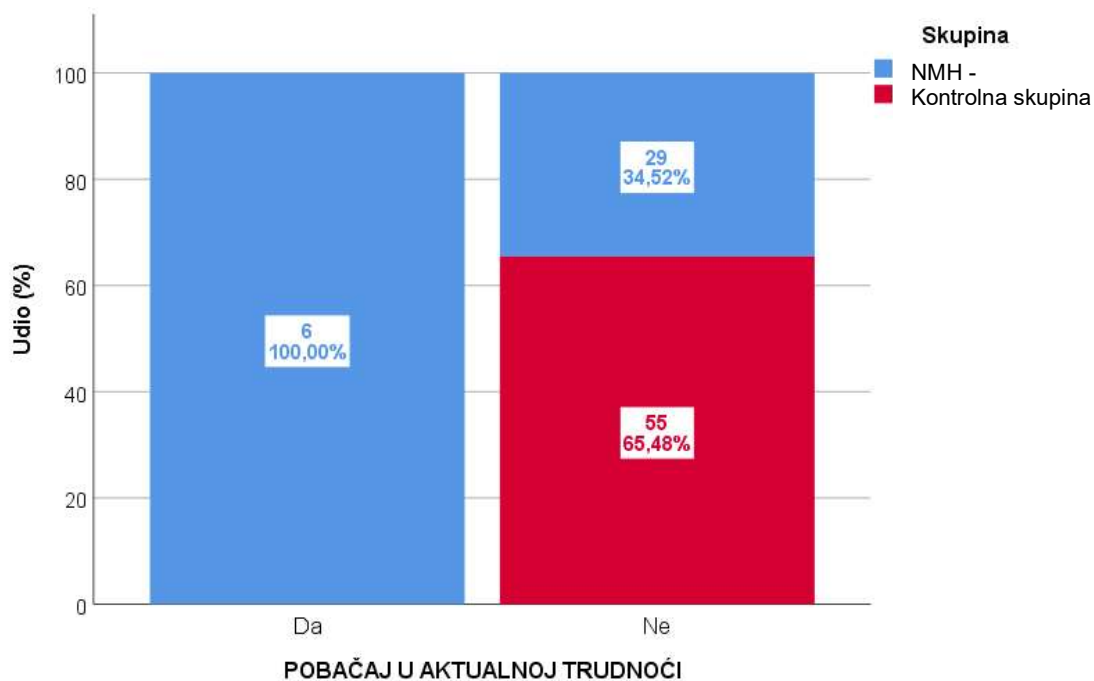
OR	0,33
95% CI	0,01-6,61
<i>P</i>	0,473

Utjecaj heparina na ishod trudnoće kod trudnica s habitualnim pobačajima i „teškim“ mutacijama za nasljednu trombofiliju prikazan je u Tablici 13., dok je ishod trudnoće u NMH+ skupini ispitanica u odnosu na kontrolnu skupinu prikazan u Tablici 14. Nije bilo značajnih povezanosti s obzirom na korištenje heparinske profilakse u odnosu na ostale skupine.

Tablica 15. Ishod trudnoće u NMH- skupini ispitanica u odnosu na kontrolnu skupinu

NASLJEDNA TROMBOFILIJA	ISHOD TRUDNOĆE		
	POBAČAJ n (%)	POROĐAJ n (%)	UKUPNO n (%)
NMH -	6 (17,1)	29 (82,9)	35 (100)
KONTROLNA SKUPINA	0 (0)	55 (100)	55 (100)
UKUPNO	6 (6,6)	84 (93,4)	90 (100)

OR	0,041
95% CI	0,002-0,751
P	0,031



Slika 15. Ishod trudnoće kod ispitanica NMH- skupine u odnosu na kontrolnu skupinu

Tablica 15. i Slika 15. prikazuju ishod trudnoće u NMH- skupini ispitanica u odnosu na kontrolnu skupinu. Ispitanice NMH- skupine u odnosu na kontrolnu skupinu imaju značajno manju vjerojatnost normalnog porođaja: OR=0,041, odnosno $1/0,041=24,39$ puta veću vjerojatnost pobačaja (OR=0,041, 95% CI=0,002-0,751; $P=0,031$).

Tablica 16. Ishod trudnoće u kontrolnoj skupini trudnica kod nositelja „teških“, odnosno „blagih“, mutacija za nasljednu trombofiliju

KONTROLNA SKUPINA	ISHOD TRUDNOĆE		
	POBAČAJ n (%)	POROĐAJ n (%)	UKUPNO n (%)
„TEŠKE“ MUTACIJE	0 (0)	3 (100)	3 (100)
„BLAGE“ MUTACIJE	0 (0)	52 (100)	52 (100)
UKUPNO	0 (0)	55 (100)	55 (100)

OR	0,07
95% CI	0,001-3,890
P	0,192

Ishod trudnoće u kontrolnoj skupini trudnica kod nositelja „teških“, odnosno „blagih“, mutacija za nasljednu trombofiliju prikazan je u Tablici 16. Nije bilo značajnih povezanosti.

Tablica 17. Patologija trudnoće u kontrolnoj skupini trudnica kod nositelja „teških“, odnosno „blagih“, mutacija za nasljednu trombofiliju

KONTROLNA SKUPINA	PATOLOGIJA TRUDNOĆE		
	UREDNA TRUDNOĆA n (%)	GESTACIJSKA HIPERTENZIJA n (%)	UKUPNO n (%)
„TEŠKE“ MUTACIJE	3 (100)	0 (0)	3 (100)
„BLAGE“ MUTACIJE	50 (96,2)	2 (3,8)	52 (100)
UKUPNO	53 (96,3)	2 (3,7)	55 (100)

OR	2,89
95% CI	0,11-72,50
P	0,519

Patologija trudnoće u kontrolnoj skupini trudnica kod nositelja „teških“, odnosno „blagih“, mutacija za nasljednu trombofiliju prikazan je u Tablici 17. Nije bilo značajnih povezanosti.

Tablica 18. Patologija fetusa u kontrolnoj skupini trudnica kod nositelja „*teških*“, odnosno „*blagih*“, mutacija za nasljednu trombofiliju

KONTROLNA SKUPINA	PATOLOGIJA FETUSA		
	BEZ PATOLOGIJE n (%)	IUGR n (%)	UKUPNO n (%)
„ <i>TEŠKE</i> “ MUTACIJE	3 (100)	0 (0)	3 (100)
„ <i>BLAGE</i> “ MUTACIJE	52 (100)	0 (0)	52 (100)
UKUPNO	55 (100)	0 (0)	55 (100)

OR	15,00
95% CI	0,25-875,36
<i>P</i>	0,192

Patologija fetusa u kontrolnoj skupini trudnica kod nositelja „*teških*“, odnosno „*blagih*“, mutacija za nasljednu trombofiliju prikazana je u Tablici 18. Nije bilo značajnih povezanosti.

6. RASPRAVA

Oko 15% klinički prepoznatih trudnoća završava pobačajem, dok habitualni pobačaji pogađaju oko 5% žena reproduktivne dobi. Iako je velik broj uzroka habitualnih pobačaja otkriven, više od 50% uzroka ostaje neobjašnjeno i zbog toga habitualni pobačaji predstavljaju izazov današnje medicine kako za doktora tako i za pacijenta. Nasljednu trombofiliju nalazimo u anamnezi velikog broja žena s habitualnim pobačajima. Velika većina nositelja mutacije za nasljednu trombofiliju neće nikada razviti kliničke znakove i ostatak će nedijagnosticirana jer nasljedna trombofilija predstavlja mali apsolutni rizik za klinički značajnu trombozu. Međutim, kada su nositelji izloženi dodatnim rizičnim faktorima poput trudnoće ili uzimanja oralnih kontraceptiva, rizik za razvoj tromboze značajno se povećava i može biti klinički evidentan. Iako se patogeneza trombofilije temelji na formiranju mikrotromba, kod velike većine žena s habitualnim pobačajima i nasljednom trombofilijom nalazimo uredan patohistološki nalaz što ukazuje na moguće druge putove odgovorne za patološki ishod (179). Također, nasljedna trombofilija kao uzrok habitualnih pobačaja nalazi svoju osnovu i u činjenici da se mutacije za nasljednu trombofiliju statistički značajno češće nalaze kod žena s habitualnim pobačajima u odnosu na populaciju bez takve patologije (136, 180). Ipak, i dalje su prisutna oprečna mišljenja raznih autora o izravnoj povezanosti nasljedne trombofilije i spontanih pobačaja.

Parand i suradnici 2013. analizirali su zastupljenost nasljedne trombofilije u skupini od 90 žena s habitualnim pobačajima u usporedbi s 44 žene s urednim prethodnim trudnoćama. Učestalost deficijencije PS bila je statistički značajno zastupljenija u ispitivanoj skupini ($P=0,03$) u odnosu na kontrolnu skupnu, a prisutnost ostalih mutacija nije se statistički značajno razlikovala između dvije grupe (181). Do sličnog su zaključka došli i Younis i sur. 2003. analizirajući prisutnost FVL u skupini ispitanica s habitualnim pobačajima naglašavajući statistički značajno veću učestalost FVL kod ispitanica u odnosu na kontrolnu skupinu (182), kao i Pihusch i sur. analizirajući prevalenciju PGM-a u skupini žena s habitualnim pobačajima. (183). Carp i suradnici studijom iz 2002. pak opovrgavaju povezanost nasljedne trombofilije i habitualnih pobačaja. Prisutnost mutacija za nasljednu trombofiliju nije se pokazala statistički značajno većom kod 108 ispitanica s habitualnim pobačajima u odnosu na 82 ispitanice u kontrolnoj skupini (184).

Različiti stavovi o uzročno posljedičnoj vezi dviju patologija dovode i do neusklađenih mišljenja o primjeni NMH-a u profilaktičnim dozama kod osoba s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima. Ova studija prva je prospektivna studija na ovim prostorima koja analizira jedan od mogućih uzroka habitualnih pobačaja i njegovo liječenje, vrlo čest problem kod žena reproduktivne dobi.

U studiju su uključene tri kohorte: prva skupina s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima koja je primala profilaksu NMH-a (NMH+), druga skupina s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima koja nije dobivala profilaksu NMH-a (NMH-) i treća kontrolna skupina s nasljednom trombofilijom i urednom osobnom (negativnom na TE bolesti) i opstetričkom (negativnom na patologiju vezanu uz insuficijenciju posteljice) anamnezom koja nije primala profilaksu NMH-a. Uzimajući u obzir demografske vrijednosti, ispitivane kohorte razlikovale su se po životnoj dobi pri čemu su ispitanice kontrolne skupine bile značajno mlađe u odnosu na ispitivane skupine ($P= 0,001$), što je i za očekivati s obzirom da kontrolnu skupinu čine zdrave nulipare, puno rjeđe primipare. Ispitanice kontrolne skupine također su imale značajno niži ITM u odnosu na ispitivane skupine ($P< 0,001$), što se također može objasniti mlađom i zdravijom kohortom. Uspoređujući živorođenu djecu, u sve tri skupine nije bilo značajnije razlike u tjednu porođaja, Apgar indeksu prve i pete minute života te pH-u umbilikalne vene (Tablice 1., 2. i 3.).

U istraživanje su u najvećem broju uključene nulipare (54,9%, 54,3% i 61,9% svih ispitanica). Ovisno o broju pobačaja, definicija habitualnih pobačaja i dalje nije usuglašena na svjetskoj razini. Royal College of Obstetrics and Gynaecologists (RCOG) habitualne pobačaje definira kao tri ili više spontanih pobačaja, a danske i američke smjernice (ASRM) u definiciji navode dva ili više spontanih pobačaja (217, 218). S obzirom da je kod osoba s dva spontana pobačaja rizik za ponovni pobačaj sličan riziku kao kod osobe s tri spontana gubitka trudnoće, definicija habitualnog pobačaja u ovoj studiji definirana je kao dva ili više. U Klinici za ženske bolesti i porođaje s prekonceptcijskom obradom započinje se nakon dva spontana pobačaja što je primijenjeno i u ovom istraživanju; najveći broj žena u NMH+ i NMH- skupini imao je dva retenirana pobačaja. U NMH+ skupini bilo je nešto više ispitanica s tri ili više spontanih pobačaja (Tablica 3.).

Istraživanjem problematike koju nosi nasljedna trombofilija analiziralo se i pitanje isplativosti probira opće populacije asimptomatskih trudnica s pozitivnom obiteljskom anamnezom u donosu na negativnu anamnezu na nasljednu trombofiliju, tj. tromboembolijske bolesti (TE) u bližoj obitelji. Većina dosadašnjih studija probir smatra nepotrebnim trošenjem resursa („*cost benefit*“ analiza) s obzirom na malu vjerojatnost razvoja TE kod nositelja mutacije i upitnosti primjene antikoagulacijske terapije u slučaju pozitivnog rezultata probira. Po većini istraživača, probir je preporučen samo kod osoba čiji su bliski članovi obitelji nositelji mutacija s visokim rizikom za razvoj tromboembolijskih bolesti, poput homozigota za FVL, dvostrukih heterozigota za PGM i FVL, osoba s teškom deficijencijom AT-a (185) i kod osoba koji su sami preboljeli DVT (186). Rezultati ovog istraživanja podupiru zaključke navedenih studija. Formirajući kontrolnu skupinu provedeni su testovi trombofilije kod zdravih trudnica s osobnom anamnezom negativnom na TE bolesti i kod nulipara ili kod multipara s opstetričkom anamnezom negativnom na patologiju vezanu uz insuficijenciju posteljice. Od

ukupno 90 zdravih trudnica koje su dolazile na redovite kontrole u trudničku ambulantu Klinike za ženske bolesti i porođaje, njih 55 (61,2%) imalo je pozitivne testove na nasljednu trombofiliju. Od ukupnog broja nositelja mutacije za nasljednu trombofiliju, njih 52 (94,5%) nositelji su „*blagih*“ mutacija - 13 (25%) ispitanica nositelj je mutacije MTHFR gena (homozigot/heterozigot), 16 (30,8%) ispitanica nositelj je mutacije PAI-1 gena (heterozigot/homozigot) i 23 (44,2%) ispitanice imaju kombiniranu mutaciju PAI-1+MTHFR. Neovisno o tipu mutacija, perinatalni i neonatalni ishod, kao i tijek babinja, u kontrolnoj skupini bio je uredan. Od 55 ispitanica kontrolne skupine, obiteljska anamneza na TE bolesti bila je pozitivna u 18,2% ispitanica. Prikazani rezultati upućuju na izrazito veliku učestalost pojave mutacija za nasljednu trombofiliju kod asimptomatskih trudnica koje su dolazile na redovite kontrole u Kliniku za ženske bolesti i porođaje. Do sličnih zaključaka došli su Mazzucconi i suradnici 2015. analizirajući prisutnost mutacije gena za nasljednu trombofiliju (FVL, PGM, PS, AT i PC) u skupini zdravih primipara s prethodno urednom trudnoćom te u skupini ispitanica s habitualnim pobačajima. Iako autori u analizu nisu uključili „*blage*“ mutacije MTHFR i PAI-1, postotak nositeljica mutacija na nasljednu trombofiliju bio je prilično visok (10,8% ispitanica u odnosu na 23% ispitanice s prethodnim neuspješnim trudnoćama, $P < 0,015$) (187). Istovjetno rezultatima ove studije, sve asimptomatske nositeljice mutacije imale su uredan perinatalni i neonatalni ishod. Navedenim rezultatima potvrđuje se neopravdanost probira na nasljednu trombofiliju kod asimptomatskih trudnica, odnosno trudnica s urednom opstetričkom i osobnom anamnezom.

U NMH+ i NMH- skupini, od 168 žena s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima, obiteljska anamneza na TE bolesti (DVT, PE, IM, CVI) bila je pozitivna kod 39 (23,2%) ispitanica. S obzirom na slabu povezanost obiteljske anamneze pozitivne na TE i kliničke manifestacije nasljedne trombofilije, ovim istraživanjem potvrđuje se prethodno navedena potreba za probirom samo kod asimptomatskih osoba čiji su članovi obitelji nositelji mutacija s visokim rizikom za razvoj tromboembolijskih bolesti.

Nasljedna trombofilija može uzrokovati rane (prvo tromjesečje) i kasne (drugo tromjesečje) spontane pobačaje. U ovom istraživanju, od ukupnog broja habitualnih pobačaja, čak 90,5% dogodilo ih se do 12.-og tjedna trudnoće (Tablica 5.). Veća učestalost ranih gubitaka trudnoće objašnjava se teorijom da infarkti posteljice kod nositelja mutacije za trombofiliju nastaju rano i samim time dolazi do ranijeg odumiranja ploda. Ipak, teorija protektivnog djelovanja hipoksičnog medija za uredan razvoj rane trudnoće (188, 189) nasljednoj trombofiliji daje protektivnu ulogu u ranoj trudnoći, dovodeći time u pitanje uzročno posljedičnu vezu mutacija i ranih gubitaka trudnoće. Roque i sur. 2004. godine analizirali su povezanost nasljedne i stečene trombofilije s patološkim ishodima trudnoće. Analizirana je kohorta od 491 žene s patološkim ishodima prethodnih trudnoća. U zaključku se ističe mogući zaštitni učinak nasljedne trombofilije na rane trudnoće (<10.-og tjedna trudnoće) i

statistički značajniji patološki ishod kod nositelja nakon 14.-tog tjedna gestacije u odnosu na ranu trudnoću (IUGR, PE, fetalna smrt) (166). Do sličnog su zaključka došli i Sottilotta i suradnici u svojoj studiji iz 2006. godine (137). Potrebna su daljnja istraživanja da bi se potvrdila jedna od ovih hipoteza. U suprotnosti s navedenim studijama, u istraživanju objavljenom 2000. godine, Brenner i suradnici istaknuli su veću učestalost spontanih pobačaja u prvom u odnosu na drugo tromjesečje kod ispitanica s nasljednom trombofilijom (68% u usporedbi s 28%) (190). Do istog su zaključka došli i Carp i suradnici (191), kao i Visser i suradnici (175). Na temelju rezultata ovog i navedenih istraživanja, nasljedna trombofilija značajnije uzrokuje pobačaje u prvom tromjesečju u odnosu na pobačaje u drugom tromjesečju te se, u slučaju profilakse, NMH preporuča uvesti odmah po UZV dijagnosticiranim pozitivnim KČS-ovima.

Neovisno o uzroku, komplikacije uzrokovane insuficijencijom posteljice kao što su PE, HELLP sindrom, fetalna smrt, IUGR i abrupcija posteljice, uvijek nastaju nakon završetka placencije, tj. u drugoj polovici trudnoće (192, 193). Od kada je grupa autora 1996. godine objavila EPCOT studiju (83), nasljedna trombofilija pokazala se kao jedan od mogućih „novih“ uzročnika ishemijskih promjena posteljice i kasnijih komplikacija trudnoće, pri čemu EPCOT posebno naglašava fetalnu smrt (nakon 28.-og tjedna trudnoće) kao glavnu posljedicu trombofilije. U navedenoj studiji posebno se ističe patološki ishod trudnoće kod nositelja višestrukih mutacija. Povezanost nasljedne trombofilije s patologijom insuficijencije posteljice potvrdili su i drugi znanstvenici (193, 194). Kao reakcija na „otkrivanje uzročnika“ provedena su brojna istraživanja s NMH-om kao mogućom preventivnom mjerom. Proturječnost dokaza o utjecaju heparina na prevenciju patologije poput PE-a, abrupcije posteljice i IUGR-a, dovodi do različitih mišljenja autora od kojih jedni antikoagulacijsku terapiju kod takvih trudnica smatraju opravdanom, a drugi neopravdanom. Primjerice, FRUIT studija je trudnice s nasljednom trombofilijom i uteroplacentarnom insuficijencijom u prethodnoj trudnoći podijelila u dvije skupine; prvoj skupini u terapiju je uključen aspirin u kombinaciji s NMH-om, dok je druga skupina uzimala samo aspirin. Incidencija hipertenzivnih poremećaja u promatranoj trudnoći nije se razlikovala između dvije skupine. Također, obje su grupe ultrazvučnim analizama imale istu stopu rasta fetusa, istu brzinu protoka mjerenu u uterinoj i umbilikalnoj arteriji te istu neonatalnu porođajnu težinu (195). Sličan zaključak donijela je i TIPPS multinacionalna studija koja je u analizu uključila 292 trudnice s nasljednom trombofilijom i rizikom za DVT ili s uteroplacentarnom insuficijencijom u prethodnoj trudnoći. Polovica trudnica koja je profilaktično primala NMH nije imala statistički značajno bolji perinatalni ishod u odnosu na polovicu koja nije uzimala heparin (196).

U suprotnosti s navedenim istraživanjima, studija iz Sveučilišne bolnice u Nîmesu u istraživanje je uključila 160 žena s jednim neobjašnjenim gubitkom trudnoće nakon 10.-tog tjedna gestacije koje su ujedno bile heterozigoti za FVL, heterozigoti za protrombinski gen ili

imale deficijenciju PS. Prije koncepcije svim je ženama provedena terapija s folnom kiselinom u dozi od 5mg/dan da bi se eliminirala hipohomocisteinemija. Ispitanice su podijeljene u dvije skupine ovisno o tome jesu li tijekom trudnoće primale niske doze aspirina (100mg/dan) ili NMH. Ispitanice koje su uzimale NMH imale su višu stopu živorođene djece (86%) u odnosu na ispitanice liječene aspirinom (28,8%) (OR 15,5, 95% CI 7-34). Također, skupina liječena heparinom imala je statistički značajno veću porođajnu težinu novorođene djece i nižu frekvenciju intrauterinog zastoja rasta u odnosu na grupu koja je primala aspirin (197).

Rodger i suradnici 2014. godine objavili su meta analizu randomiziranih kontroliranih studija u kojima su analizirali utjecaj heparina na prevenciju patologija trudnoće uzrokovanih insuficijencijom posteljice. Kao primarni ishod analizirani su PE, IUGR i zadržani pobačaj prije 20.-tog tjedna. U skupini trudnica s NMH-om, u 18,7% slučajeva razvila se insuficijencija posteljice, dok ih je nešto više (42,9%) insuficijenciju razvilo u skupini bez heparina ($P < 0,01$) (198).

Rezultati ovog istraživanja također analiziraju povezanost nasljedne trombofilije s kliničkom prezentacijom insuficijencije posteljičnog tkiva. Varijable koje su se analizirale su: majčina patologija trudnoće (prethodne i sadašnje) i patologija fetusa (iz prethodne i sadašnje trudnoće) za koje se smatra da nastaju kao posljedica placentarne insuficijencije. Patologija trudnoće uključivala je GH, PE, HELLP sindrom i abrupciju posteljice. Fetalna patologija uključivala je IUGR i fetalnu smrt.

Komplikacije prethodnih trudnoća i fetalna patologija

Potrebno je naglasiti da kod ispitanica NMH+ skupine u prethodnim trudnoćama nije provedena profilaksa heparinom. S obzirom da je većini ispitanica sadašnja trudnoća prva (53%), analiza se vršila na ukupno 47% ispitanica NMH+ i NMH- skupine. U skupini NMH+ zabilježene su četiri fetalne smrti (3%), od kojih je jedna ispitanica tijekom trudnoće razvila HELLP sindrom, a preostale tri nisu imale vidljive patologije u trudnoći. Testiranjem na nasljednu trombofiliju kod ispitanica s fetalnom smrću verificirana je mutacija PAI-1 4G/5G heterozigot (dvije ispitanice), MTHFR C677T heterozigot i heterozigot FVL. Kod 43,6% trudnica NMH+ skupine i 44,1% trudnica NMH- skupine prethodna trudnoća bila je urednog tijeka. U NMH+ skupini zabilježene su tri (2,3%) prethodne trudnoće s IUGR-om, dok se u NMH- skupini javio jedan slučaj IUGR-a (2,9%).

Patologija sadašnje trudnoće i fetalna patologija

Analizom sadašnje trudnoće, od ukupnog broja ispitanica NMH+ i NMH- skupine s nasljednom trombofilijom, 88% ih je imalo urednu trudnoću neovisno o primjeni heparina, odnosno 90,2% u NMH+ skupini i 80,0% u NMH- skupini. U pogledu prisutne patologije, za spomenuti je samo GH koju je razvilo 8,3% ispitanica NMH+ skupine te 20% ispitanica NMH- skupine. U NMH+ skupini zabilježeno je osam (6%) trudnoća s intrauterinim zastojem rasta,

a u NMH- skupini bio je zabilježen jedan slučaj IUGR-a (2,9%). Fetalne smrti nakon primjene heparina u NMH+ skupini nije bilo (Tablica 5.). Iako se broj slučajeva fetalne smrti nakon primjene heparina smanjio, vrijednost nije bila statistički značajna ($P=0,122$).

Na temelju prikazanih rezultata možemo zaključiti da primjena heparina nije neophodna za uredan perinatalni ishod u skupini trudnica s nasljednom trombofilijom i kliničkom slikom placentarne insuficijencije u prethodnoj trudnoći. Ipak ne smijemo zanemariti klinički značaj mogućeg utjecaja heparina na smanjenje broja patoloških ishoda poput fetalne smrti. S obzirom na mali broj ispitanica u ovoj studiji potrebna su daljnja istraživanja da bi se ustanovila opravdanost primjene NMH kod trudnica s nasljednom trombofilijom i patološkim ishodima prethodnih trudnoća (PE, IUGR, abrupcija posteljice, HEELP sindrom i fetalna smrt).

Prema dosadašnjim istraživanjima i saznanjima, određene mutacije gena za nasljednu trombofiliju povezane su s težim, odnosno blažim, kliničkim slikama. Ako je osoba nositelj više mutacija, vjerojatnost da razvije patološku kliničku sliku je veća. Ispitanice u sve tri kohortne skupine nositelji su pojedinačnih ili višestrukih mutacija u različitim kombinacijama. Zbog boljeg i jednostavnijeg prikaza utjecaja različitih mutacija na tijek trudnoće te zbog prikaza efekta profilakse heparinom u odnosu na tip mutacije, mutacije smo proizvoljno podijelili u dvije podgrupe- „teške“ i „blage“. U „teške“ mutacije uključene su one koje po svim dosadašnjim saznanjima češće mogu izazvati tromboembolijske bolesti, a to su: heterozigot i homozigot FVL, heterozigot i homozigot PGM-a, deficijencija AT-a, PC i PS. „Blage“ mutacije rjeđe stvaraju kliničku sliku i samim su time po dosadašnjim saznanjima „manje opasne“ i uključuju: heterozigote i homozigote MTHFR-e i heterozigote i homozigote PAI-1 gena. Provodeći testove trombofilije trudnicama s ovih područja primjećeno je da nijedna ispitanica nije imala „tešku“ mutaciju poput homozigota za FVL, homozigota za PG i deficijenciju AT-a, a zastupljenost deficijencije PC bila je izrazito niska. Najveći broj ispitanica nositelji su „blagih“ mutacija. U usporedbi s ispitanicama obrađivanim u KBC-u Zagreb, dva izraelska autora ističu sličnu raspodjelu tipova mutacije za nasljednu trombofiliju među ispitivanom populacijom u dva različita grada u Izraelu. Brennen i suradnici su analizom mutacija za nasljednu trombofiliju u skupini ispitanica s habitualnim pobačajima u najvećem postotku imali heterozigote FVL-a, deficijenciju PS, a potom kombinirane mutacije, dok su Carp i suradnici unatoč najvećem postotku MTHFR mutacije u ispitivanoj skupini imali i prilično visok postotak ispitanica s FVL-om, PGM-om i deficijencijom PS (190, 191). Kao i u Zagrebu, deficijencija AT-a i PC nije bila prisutna ili je bila zastupljena u jakom malom broju među ispitanicama. Objašnjenje leži u epidemiologiji raspodjele mutacija za nasljednu trombofiliju, tj. vrstama mutacija, koje su istovjetne svim zemljama Mediteranske regije.

U ispitivanim kohortama pojedine mutacije pojavljivale su se rjeđe ili češće, ovisno o skupini ispitanica. U NMH+ skupini bilo je 23,3% ispitanica s „teškim“ mutacijama u odnosu na 2,9%

u NMH- i 5,5% u kontrolnoj skupini. Očekivano, prisutna je značajna razlika u učestalosti „*teških*“ mutacija (značajno češće u skupini koja je primala heparin u odnosu na kontrolnu skupinu $P=0,018$ te na skupinu koja nije primala heparin, $P=0,011$) (Tablica 6., Slika 10.). S obzirom na nedostatak homozigota za FVL i PGM, tijekom analize se odustalo od podjele na homozigote i heterozigote. U NMH+ skupini bilo je 58,1% ispitanica s FVL-om, 29,0% ispitanica s PGM-om, 9,7% imalo je deficijenciju proteina S i 3,2% ispitanica deficijenciju proteina C. U NMH- skupini „*tešku*“ mutaciju imala je samo jedna ispitanica (100%-tna deficijencija proteina S), dok je u kontrolnoj skupini 33,3% ispitanica bilo s FVL-om, 33,3% s PGM-om te 33,3% ispitanica s deficijencijom PS-a. U smislu „*blagih*“ mutacija u NMH+ skupini, zabilježeno je 10,8% mutacija za MTHFR, 31,4% PAI-1 mutacija te 57,8% kombiniranih mutacija PAI-1+MTHFR. U NMH- skupini nalazilo se 20,6% ispitanica s MTHFR mutacijom, 38,2% s PAI-1 mutacijom i 41,2% s kombiniranim MTHFR +PAI-1 mutacijama. Kontrolna skupina imala je 25,0% MTHFR mutacija, 30,8% PAI-1 mutacija i 44,2% kombiniranih mutacija. Kao što je i za očekivati, najveći broj ispitanica imao je kombinaciju „*blagih*“ mutacija za MTHFR i PAI-1. Zanimljivo je da je veliki broj ispitanica imao PAI-1 mutaciju koju brojni drugi istraživači i studije ne uvrštavaju u skupinu nasljednih trombofilija s obzirom na njenu veliku učestalost i slabu povezanost s patologijom. Temeljem prikazanih rezultata, mutacija za PAI-1 definitivno je tip nasljedne trombofilije koju ne bi trebalo zanemariti.

Da bi se bolje prikazala patologija trudnoće i fetusa uzrokovana insuficijencijom posteljice u ovisnosti o kompleksnosti mutacija, analiza se vršila na svim ispitanicama s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima neovisno o primjeni heparina (NMH+ i NMH- skupina). U odnosu na dvije podgrupe („*teška*“ u usporedbi s „*blagom*“ trombofilijom), analizirala se patologija prethodne i sadašnje trudnoće, patologija fetusa, pobačaji u aktualnoj trudnoći, tjedan i način porođaja, neonatalni ishod i komplikacije u babinju (Tablica 7.). Neovisno o tipu mutacije, najveći broj habitualnih pobačaja događao se u prvom tromjesečju trudnoće. U skupini „*teških*“ mutacija u prethodnim trudnoćama, kada su sve ispitanice bile bez profilakse heparinom, značajno je više bilo GH-a te PE-a ($P=0,039$). Fetalna patologija u prethodnim trudnoćama nije se statistički značajno razlikovala između dvije podgrupe ($P= 0,058$). Međutim, od kliničkog je značaja razlika u broju intrauterinog zastoja rasta između dvije podgrupe, što je bilo i za očekivati, odnosno nositelji „*teških*“ mutacija imali su nešto više (9,4%) slučajeva IUGR-a u odnosu na nositelje „*blagih*“ mutacija (0,7%). Patologija sadašnje trudnoće, patologija fetusa, tjedan i način porođaja, pobačaji u aktualnoj trudnoći, rani neonatalni ishod i rani tijek babinja nisu se statistički značajno razlikovali između dvije podgrupe.

Zbog detaljnijeg prikaza utjecaja kompleksnosti mutacije („*teška*“ u usporedbi s „*blagom*“), na patologiju trudnoće i fetusa uzrokovanu insuficijencijom posteljice u ovisnosti o primjeni

niskomolekularnog heparina rađena je zasebna analiza u sve tri grupe ispitanica (NMH+, NMH-, kontrolna skupina).

U NMH+ skupini pod utjecajem heparina nije bilo statistički značajne razlike u tjednima habitualnih pobačaja između nositelja „*teških*“ i „*blagih*“ mutacija. Analizom patologije uzrokovane insuficijencijom posteljice u prethodnim trudnoćama, u skupini „*teških*“ mutacija bilo je značajno više GH-a te PE-a ($P=0,024$). Patologija uzrokovana insuficijencijom posteljice promatrane trudnoće, patologija fetusa, broj pobačaja u aktualnoj trudnoći, tjedan i način porođaja, neonatalni ishod te tijek babinja nisu se značajno razlikovali između dvije podgrupe (Tablica 8.).

U NMH- skupini bez profilakse heparinom od ukupnog broja ispitanica samo je jedna (2,8%) osoba imala „*tešku*“ trombofiliju, deficijenciju PS-a. U ispitivanoj skupini nije bilo statistički značajne razlike u tjednima habitualnih pobačaja između nositelja „*teških*“ i „*blagih*“ mutacija. U skupini s „*blagim*“ mutacijama značajno je češći bio uredan nalaz ishoda prethodnih trudnoća ($P=0,029$). Patologija uzrokovana insuficijencijom posteljice promatrane trudnoće, patologija fetusa, broj pobačaja u aktualnoj trudnoći, tjedan i način porođaja, neonatalni ishod te tijek babinja nisu se značajno razlikovali između dvije podgrupe (Tablica 9.).

U kontrolnoj skupini zdravih žena, od ukupnih 55 ispitanica, tri (5,45%) su ispitanice bile nositelji mutacije za „*tešku*“ trombofiliju; PGM heterozigot, FVL heterozigot, deficijencija PS-a. Patologija uzrokovana insuficijencijom posteljice promatrane trudnoće, patologija fetusa, broj pobačaja u aktualnoj trudnoći, tjedan i način porođaja, neonatalni ishod te tijek babinja nisu se značajno razlikovali između dvije podgrupe (Tablica 10.).

Za zaključiti je da kod trudnica s opterećenom opstetričkom anamnezom (habitualni pobačaji) koje su nositelji „*teških*“ mutacija, primjena NMH-a prevenira razvoj patologije trudnoće i fetusa uzrokovane insuficijencijom posteljice (PE, IUGR) (Tablice 7., 8. i 9.). Kod trudnica s urednom opstetričkom anamnezom (kontrolna skupina) kompleksnost mutacija nije značajnije utjecala na razvoj patologije trudnoće i neonatalni ishod, iako je ovdje potrebno istaknuti otežano donošenje zaključka s obzirom na malen broj ispitanica s „*teškom*“ trombofilijom (Tablica 10.).

Da bi se prikazali tijek trudnoće, porođaj, neonatalni ishod i rane komplikacije babinja kod trudnica s habitualnim pobačajima i nasljednom trombofilijom u ovisnosti o primjeni heparina te u skupini žena s osobnom i opstetričkom anamnezom neopterećenom TE bolestima i patologijom placentarne insuficijencije, analizirane su sve tri kohorte ispitanica neovisno o tipu mutacija (Tablica 6.). Sve tri skupine u najvećem broju slučajeva imale su terminski porođaj, između 37.-og i 42.-og tjedna trudnoće (93,8%, 89,7% i 100,0%), čime se rezultati ove studije podudaraju s rezultatima drugih autora (175, 187, 190, 191). Skupina NMH- imala je nešto veći postotak prijevremenih porođaja u odnosu na skupinu NMH+ i kontrolnu skupinu iako broj nije bio statistički značajan; 6,9% porođaja između 28.-og i 34.-og tjedna

trudnoće i 3,4% porođaja između 34.-og i 37.-og tjedna trudnoće. Spontani pobačaj u istraživanju je definiran kao gubitak trudnoće prije 22.-og tjedna, odnosno spontani pobačaj čeda lakšeg od 500 grama tjelesne težine. S obzirom da su habitualni pobačaji, kako im i samo ime kaže, rekurentni, istraživanjem se željelo ukazati na stopu ponovne pojavnosti zadržanog pobačaja kod trudnica s nasljednom trombofilijom u ovisnosti o profilaktičnoj primjeni niskomolekularnog heparina. Znajući da je u više od 50% slučajeva spontanih pobačaja uzrok kromosomopatija ploda, svakoj je od ispitanica s ponovnim spontanim pobačajem učinjena citogenetska analiza kiretmana koja je u svim slučajevima (NMH+, NMH-) pokazala uredan nalaz kromosoma ploda. NMH- skupina imala je značajno veći udio spontanih pobačaja u aktualnoj trudnoći u odnosu na NMH+ skupinu (17,1% u odnosu na 2,3%; $P=0,003$; Slika 11.). Ispitanice s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima koje su tijekom trudnoće uzimale NMH profilaksu imaju 8,97 puta veću vjerojatnost urednog ishoda trudnoće u odnosu na trudnice bez NMH profilakse ($OR=8,97$, 95% $CI=2,11-37,96$, $P=0,003$) (Tablica 11., Slika 13.). Uredan ishod trudnoće definiran je kao terminski porođaj bez ponovnog gubitka trudnoće prije 22.-og tjedna i bez razvoja patologije vezane uz insuficijenciju posteljice. Uredan rani neonatalni ishod definiran je kao porođaj terminskog živorođenog neonatusa bez pojave neonatalne patologije koja nastaje kao posljedica insuficijencije posteljice (zastoj rasta, asfiksija kod poroda). S obzirom na veći broj pobačaja, skupina NMH- imala je značajno manji broj terminskih urednih porođaja i samim time neonatalnih ishoda u odnosu na NMH+ (17,1% u usporedbi s 2,3%; $P=0,001$; Slika 12.).

Dosadašnja provedena istraživanja o utjecaju heparina na ishod trudnoća kod žena s habitualnim pobačajima i nasljednom trombofilijom vrlo su različita s obzirom na različito primijenjenu metodologiju tijekom istraživanja, različite dijagnostičke kriterije habitualnih pobačaja i različitu primjenjivanu profilaksu na ispitivanim skupinama, a spomenute razlike dovele su do teškoća prilikom usporedbe i objašnjavanja rezultata. Deligiannidis i suradnici 2007. istaknuli su važnost primjene heparina kod trudnica s trombofilijom (nasljednom ili stečenom) i habitualnim pobačajima za prevenciju ponovnog spontanog pobačaja. Istraživanjem su obuhvatili 29 ispitanica s trombofilijom i habitualnim pobačajima koje su tijekom promatrane trudnoće primale NMH i aspirin i kontrolnu skupinu od 23 ispitanice s habitualnim pobačajima i trombofilijom koje su bile bez NMH profilakse tijekom promatrane trudnoće. Kod 29 trudnica u ispitivanoj skupini, jedna je trudnoća završila zadržanim pobačajem. U kontrolnoj skupini rodilo je šest ispitanica, dok je 17 imalo ponovni zadržani pobačaj ($P=0,04$; $OR\ 9,88$; 95% $CI\ 1,02-470,35$) (199). U zaključku se ističe potreba za probirom na nasljednu trombofiliju kod svih parova s habitualnim pobačajima, kao i pozitivan učinak NMH-a i aspirina kod trudnica s habitualnim pobačajima. Do sličnog su zaključka došli i Carp i suradnici koji su analizirali djelovanje heparina kod trudnica s habitualnim pobačajima i nasljednom trombofilijom. Prospektivna studija uključila je 37 ispitanica koje su

primale NMH i 48 ispitanica iz kontrolne skupine koje nisu primale heparinsku terapiju. Od 37 ispitanica s NMH-om, njih 26 (70,2%) imalo je živorođeno dijete, dok je od 48 ispitanica iz kontrolne skupine njih 21 (43,8%) završilo trudnoću s živorođenim djetetom ($P < 0,02$). U zaključku se ističe protektivna vrijednost NMH-a kod trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima (191). Ističući važnost tromboprolifakse kod žena s habitualnim pobačajima i trombofilijom, LIVE-ENOX studija naglašava sigurnost i efikasnost primjene heparina u trudnoći neovisno o profilaktičnoj dozi (0,4 ili 0,8) (200). Pet godina prije, ista grupa autora svojom je studijom istaknula važnost primjene NMH-a kod ispitanica s habitualnim pobačajima i trombofilijom za prevenciju ponovnog spontanog pobačaja. Prospektivni dio studije obuhvatio je 50 ispitanica s habitualnim pobačajima i nekim od oblika trombofilije (nasljednom ili stečenom) te njihovu 61 trudnoću tijekom koje su dobivale NMH profilaksu. Od 61 trudnoće, 46 (75%) trudnoća završilo je živorođenim djetetom. Retrospektivnom analizom istih ispitanica bez heparinske terapije, od 193 trudnoće samo ih je 38 (20%) završilo porođajem živorođenog djeteta ($P > 0,00001$) (190).

Trentačno je u tijeku nizozemska multicentrična randomizirana kontrolirana studija ALIFE2 kojom se kao primarni ishod analizira živorođenost kod trudnica s habitualnim pobačajima (>2) i nasljednom trombofilijom u ovisnosti o primjeni NMH-a (201).

Rezultati našeg istraživanja potvrđuju efikasnost primjene niskomolekularnog heparina kod trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima (>2) za dobar perinatalni ishod, odnosno za živorođenost neonatusa kao primarni ishod.

Daljnjom analizom rezultata ove studije način porođaja (vaginalni porođaj u odnosu na carski rez) nije se značajnije statistički razlikovao između tri skupine iako je NMH- skupina imala veći broj porođaja carskim rezom (41,4%) u usporedbi s NMH+ skupinom (38,5%) i kontrolnom skupinom (27,3%). Tijekom boravka u bolnici nijedna ispitanica u bilo kojoj od tri skupine nije razvila komplikacije ranog babinja u obliku TE bolesti (IM, DVT, CVI).

Ishod trudnoće (pobačaj u odnosu na porođaj) analizirao se u ovisnosti o kompleksnosti mutacija u skupinama s habitualnim pobačajima i nasljednom trombofilijom (NMH+ i NMH- skupina). Zastupljenost „*blagih*“ mutacija u NMH+ skupini iznosila je 76,7% (102 ispitanice), dok je u NMH- skupini broj nositelja blagih mutacija bio puno veći, odnosno obuhvaćao je 97% (34 ispitanice). Uspoređujući ishode trudnoća kod nosioca „*blagih*“ mutacija u ovisnosti o primjeni NMH-a dobiveni su sljedeći rezultati. U NMH+ skupini tri su trudnoće su završile ponovnim spontanom pobačajem (pobačaj u odnosu na porođaj- 2,9% u odnosu na 97,1%), dok je u NMH- skupini šest trudnoća završilo pobačajem (pobačaj u odnosu na porođaj- 17,6% u odnosu na 82,4%), $P = 0,008$. U skupini s habitualnim pobačajima i „*blagim*“ mutacijama za nasljednu trombofiliju, ispitanice NMH+ skupine imale su 7,07 puta veću vjerojatnost normalnog porođaja u odnosu na ispitanice NMH- skupine; $OR = 7,07$ (95% $CI = 1,66-30,09$) (Tablica 12., Slika 14.).

Zastupljenost „teških“ mutacija u NMH+ skupini obuhvatila je 23,3% ispitanica, a NMH- skupina uključivala je samo 2,8% ispitanica (jedna osoba) s teškom trombofilijom. Kod nositelja „teških“ mutacija, neovisno o primjeni heparina, sve su ispitanice imale uredan ishod trudnoće, tj. nijedna trudnoća nije završila spontanim pobačajem, $P= 0,160$ (Tablica 13.). S obzirom na minimalan broj ispitanica s teškom trombofilijom u skupini bez heparina, upitna je vrijednost dobivenog rezultata analize.

Kontrolna skupina ove studije predstavlja presjek opće populacije zdravih trudnica, asimptomatskih nositelja mutacija za nasljednu trombofiliju koje se svakodnevno susreću u trudničkim ambulantama. Analizom rezultata kontrolne skupine dobiva se uvid u razvoj kliničke slike nasljedne trombofilije u trudnoći kod do sada asimptomatskih nositelja, potrebe za probirom opće populacije zdravih trudnica te, ako je otkrivena mutacija, potreba za primjenom NMH-a. Uspoređivan je ishod trudnoće u skupini trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima koje su uzimale heparin s ishodom trudnoće asimptomatskih nositelja mutacije u kontrolnoj skupini. U NMH+ skupini tri su trudnoće završile ponovnim spontanim pobačajem (2,3%), dok je 130 ispitanica (97,7%) imalo uredan ishod. U kontrolnoj skupini, svih 55 (100%) trudnica uredno su iznijele trudnoću, odnosno, nije bilo spontanih pobačaja. Analizom rezultata dviju skupina nije bilo statistički značajne razlike u ishodu trudnoće ($P= 0,473$) (Tablica 14.). Važno je naglasiti da je zastupljenost „blagih“ mutacija u kontrolnoj skupini puno veća u odnosu na „teške“ mutacije (94,5% u usporedbi s 5,5%).

Za razliku od NMH+ skupine, uspoređujući ishode trudnoća u NMH- skupini trudnica s ishodom trudnoće asimptomatskih nositelja mutacije u kontrolnoj skupini dobivene su statistički značajne razlike. U NMH- skupini šest je trudnoća završilo ponovnim spontanim pobačajem (17,1%), a 29 ispitanica (82,9%) imalo je uredan ishod. Kao što je gore navedeno, u kontrolnoj skupini sve su ispitanice (100%) uredno iznijele trudnoću. Analizom rezultata u NMH- skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, kod ispitanica s opterećenom opstetričkom anamnezom i nasljednom trombofilijom, a bez NMH profilakse, značajno je manja vjerojatnost normalnog porođaja u odnosu na trudnice s urednom opstetričkom anamnezom i nasljednom trombofilijom neovisno o primjeni heparina, odnosno 24,39 puta je veća vjerojatnost ponovnog spontanog pobačaja, $OR=0,041$ (95% $CI=0,002-0,751$) $P=0,031$ (Tablica 15., Slika 15.).

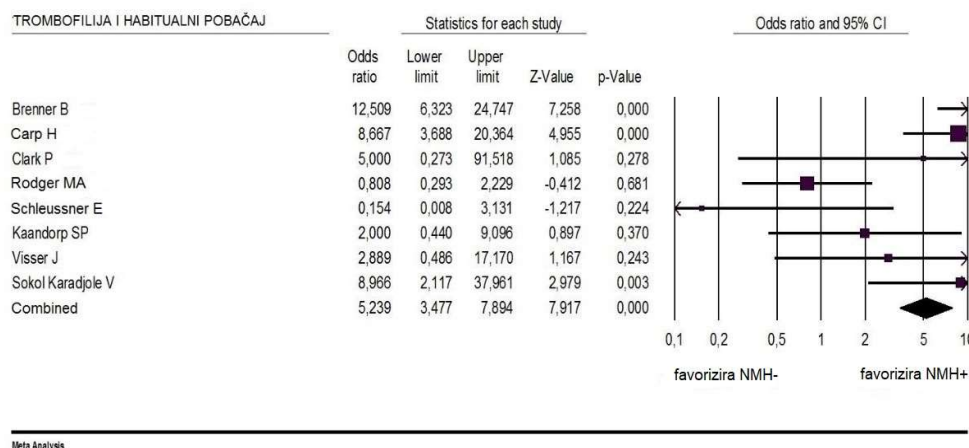
Prema dobivenim rezultatima, niskomolekularni heparin utječe na uredan ishod trudnoće kod trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima u opstetričkoj anamnezi u smislu prevencije ponovnog spontanog pobačaja. U skupini asimptomastkih nositelja mutacija za nasljednu trombofiliju s opteteričkom i osobnom anamnezom neopterećenom TE bolestima, primjena niskomolekularnog heparina nije se pokazala neophodnom za uredan ishod trudnoće. Samim time, ponovno se potvrđuje zaključak ove i dosadašnjih studija o

nepotrebnom probiru na nasljednu trombofiliju asimptomatskih trudnica s urednom osobnom i opstetričkom anamnezom.

Uspoređivanjem vrste mutacije u kontrolnoj skupini za ishod trudnoće (pobačaj u odnosu na porođaj) te patologiju trudnoće i fetusa (pozitivna u usporedbi s negativnom patologijom vezanom uz insuficijenciju posteljice), nije bilo statistički značajne razlike između asimptomatskih nositelja „teških“ u odnosu na „blage“ mutacije gena za nasljednu trombofiliju (Tablice. 16, 17. i 18). Do istih zaključaka došli su i Mazzucconi i suradnici tijekom svog istraživanja (187).

Za pregledniji prikaz i komparaciju rezultata ove studije s istraživanjima drugih autora provedena je meta analiza koja je, osim ove, uključila i osam studija o utjecaju heparinske profilakse na ishod budućih trudnoća kod trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima. Utjecaj NMH-a na ishod trudnoće mjeren je omjerom izgleda (OR) kod primijenjene i neprimijenjene profilakse NMH-om u trudnica s prethodnim habitualnim pobačajima, što je u slici 16. označeno kao NMH- ako nije primijenjena profilaksa i NMH+ ako je primijenjena profilaksa. Brenner i suradnici su u skupini trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima liječenim NMH-om imali 75% uspješnih trudnoća u odnosu na 20% uspješnih trudnoća u kontrolnoj skupini trudnica koje nisu uzimale niskomolekularni heparin ($P < 0,00001$) (190). U studiji iz 2003. Carp i suradnici verificirali su 70% uspješnih trudnoća nakon heparinske profilakse u odnosu na 43,8% uspješnih trudnoća kontrolne skupine ($P < 0,02$) (191). Studija SPIN istaknula je 70% uspješnih trudnoća uz NMH profilaksu u odnosu na 43,8% uspješnih trudnoća iz kontrolne skupine (202). Kao i kod studije SPIN, uspoređujući 87% uspješnih trudnoća uz NMH s 89,1% uspješnih trudnoća bez NMH-a, ni studija TIPPS ne nalazi statistički značajnu razliku u broju živorođene djece nakon primjene heparina (196). Do istog zaključka dolaze i autori ETHIG II grupe, Schleussner i suradnici. U ispitivanim skupinama nije bilo statistički značajne razlike u stopi živorođenih nakon primjene NMH-a (203). Kaandorp i suradnici također ističu slabiju povezanost NMH-a s većim postotkom uspješnih trudnoća (69,3% u odnosu na 52,9%; $P = 0,18$) (204). Analizom podskupine ispitanica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima, Visser i suradnici u HABENOX studiji ponovno naglašavaju važnost NMH profilakse za bolji perinatalni ishod (68,4% u odnosu na 42,9%) (175).

Jedan od ključnih rezultata ovog istraživanja je da profilaktička primjena NMH-a u trudnica s nasljednom trombofilijom i prethodnim habitualnim pobačajima za 8,9 puta povećava izglednost za uspješan ishod trudnoće u odnosu na trudnice s nasljednom trombofilijom i prethodnim habitualnim pobačajima koje nisu primjenjivale NMH (OR 8,966 (2,117- 37,961), $P = 0,003$). Ovaj je rezultat visoko statistički značajan ($P < 0,003$) i konzistentan sa zaključcima studija Brennera i Carpa (190, 191) (Slika 16.).



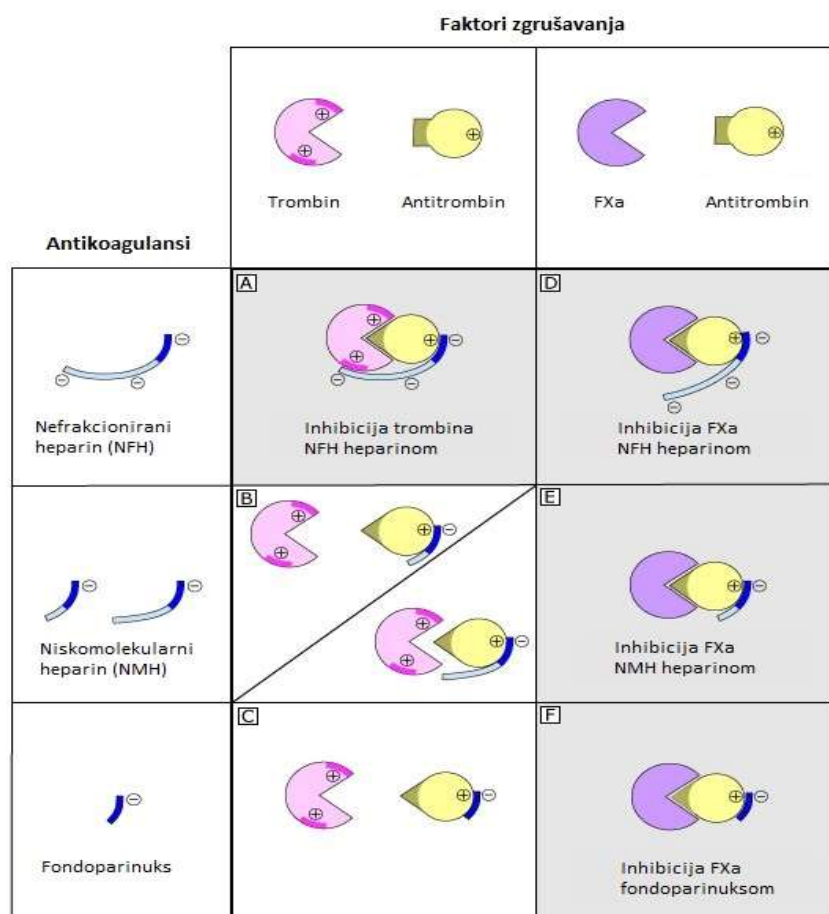
Slika 16. Utjecaj heparinske profilakse na ishod trudnoće u trudnica s nasljednom trombofilijom i prethodnim habitualnim pobačajima; meta- analiza

Na ovu je temu provedeno još meta- analiza kontroliranih randomiziranih studija. Pregledna studija iz 2016. godine analizirala je osam radova u kojima su trudnice s nasljednom trombofilijom za prevenciju ranih ponavljajućih ili kasnih neponavljajućih gubitaka trudnoće uzimale niskomolekularni heparin. U zaključku, heparin nije statistički značajnije utjecao na nižu stopu spontanih pobačaja u odnosu na skupinu bez heparina (205). U 2014. Cochranova pregledna studija analizirala je devet ispitivanja koja su uključila 1228 žena s nasljednom trombofilijom ili bez nje. Autori nisu pronašli dokaz da antikoagulacijska terapija povećava frekvenciju živorođene djece kod žena s habitualnim pobačajima i nasljednom trombofilijom (206).

Heparin je snažna multifunkcionalna molekula čija kompletna svojstva do danas još nisu u potpunosti istražena. Primarno, heparin je antikoagulacijsko sredstvo koje svoje djelovanje temelji na pojačavanju djelovanja prirodnog antikoagulansa antitrombina. Heparin također djeluje protuupalno, prevenirajući adheziju leukocita i smanjujući oštećenje tkiva različitih organa. Protuupalno svojstvo temelji se na smanjenju ekspresije adhezivnih molekula na stanicama endotela čime posljedično smanjuje adheziju monocita na stjenkama krvnih žila (207). Također, heparin inhibira tumor nekrotizirajući faktor i inducira aktivaciju i adheziju leukocita.

Otkriveno je da heparin ima utjecaj i na implantaciju. Di Simone i suradnici 1997. ustanovili su da heparin *in-vitro* potiče invaziju i diferencijaciju stanica trofoblasta (208). Također, heparin je, izravno ili neizravno, uz pomoć heparan sulfat proteoglikana ili heparin vezne molekule EGF, uključen u adheziju i invaziju blastociste u endometriju maternice (209), što je potaknulo brojne rasprave o njegovom utjecaju na postupak izvanmaterične oplodnje. Uz sva navedena svojstva, heparin još djeluje i na blokiranje aktivacije sustava komplementa. Aktivacija sustava komplementa ima važnu ulogu u započinjanju pobačaja, kao i stvaranju tromba. Zanimljivo je da je upravo blokada sustava komplementa uz antikoagulaciju najvažnije svojstvo heparina za prevenciju pobačaja (210).

Iako su i nefrakcionirani (NFH) i niskomolekularni heparin (NMH) sigurni za primjenu tijekom trudnoće, niskomolekularni heparin puno je praktičniji za primjenu i, isto tako, uzrokuje puno manje nuspojava u odnosu na NFH. I NFH i NMH svoj antikoagulacijski učinak postižu vežući se za specifično mjesto na antitrombinu izazivajući promjene u lancu zgrušavanja, prvenstveno vežući se na faktor Xa i IIa (Slika 10.).



Slika 17. Prikaz antikoagulacijskih mehanizama, heparin/fondoparinuks.

Preuzeto i prilagođeno: Bunn HF. Leung LLK, Overview of hemostasis; 2018.

Za razlikovanje NFH-a i NMH-a važan je omjer anti Xa prema IIa-aktivnosti i on za NFH iznosi 1:1, a za NMH od 2:1 do 8:1. Za razliku od NFH, djelotvornost NMH-a je dulja pa se može primjenjivati u fiksnim dozama ovisnim o tjelesnoj masi bolesnika. NMH se izlučuje putem bubrega, a laboratorijsko praćenje učinkovitosti nije potrebno osim u slučaju oštećenja bubrega. U odnosu na NFH, NMH rjeđe uzrokuje krvarenje, trombocitopeniju i heparinom induciranu osteopeniju (HIT) (211, 212). Iako su rijetke, brojne studije bavile su se nuspojavama NMH-a u trudnoći zbog njegove kontinuirane primjene. Greer i suradnici su 2005. preglednim člankom kroz 15 studija dali uvid u sigurnost i učinkovitost primjene NMH za trombotičku profilaksu i liječenje tromboembolije u trudnoći. Od 2777 trudnoća tretiranih heparinom, nijedna trudnica nije razvila trombocitopeniju (213). SPIN studija 2010. također je u svom istraživanju analizirala trombocitopeniju u skupini ispitanica s heparinom. Nijedna žena nije razvila trombocitopeniju (202). Do istog zaključka došle su HABENOX i TIPSS studije tijekom svog istraživanja, kao i istraživanje Brennera i suradnika iz 2000. i studija iz 2006. čiji su autori Dolitzky i suradnici; za vrijeme heparinske profilakse broj trombocita nije se statistički značajno mijenjao (175, 190, 196, 214). Za razliku od navedenih, određeni autori dugotrajnu primjenu NMH-a povezali su s trombocitopenijom. Badawy i suradnici 2008. analizirali su utjecaj heparina kod trudnica s habitualnim pobačajima nepoznate etiologije na ishod trudnoće. Uz primarni ishod, analizirane su i moguće nuspojave heparina. Ispitanice u skupini A uzimale su heparin, dok su ispitanice skupine B uzimale samo folnu kiselinu. U odnosu na skupinu B u kojoj nije bilo reakcija, u skupini A zabilježeno je 3,5% ispitanica s trombocitopenijom (215). Alife studija također je potvrdila trombocitopeniju analizirajući tri skupine ispitanica s habitualnim pobačajima. Prva skupina bila je liječena aspirinom i NMH-om, druga skupina aspirinom, a treća skupina dobivala je placebo. Iako razlika broja trombocita između tri skupine statistički nije bila značajna ($P=0,17$), najveći broj ispitanica s trombocitopenijom zabilježen je u prvoj skupini kod ispitanica tretiranih NMH-om i aspirinom (3,3% u odnosu na 0% u odnosu na 1,7%) (204).

Od mogućih reakcija na dugotrajnu primjenu heparina, poput krvarenja iz desni ili reakcija na koži, ova studija je zbog objektivnosti također analizirala promjene u broju trombocita tijekom heparinske profilakse. Analizom srednje vrijednosti broja trombocita (medijan) kod dolaska u bolnicu u sve tri skupine uočena je statistički značajna razlika u broju trombocita između NMH+ i NMH- skupine ispitanica (257 vs 233), pri čemu je NMH+ skupina imala značajno veće vrijednosti broja trombocita u odnosu na skupinu koja nije primala heparin, $P=0,043$ (Tablica 1., Tablica 2.). Skupini NMH+, s obzirom na primjenu heparina, krv je vađena još jednom, krajem trećeg tromjesečja pred porođaj. Značajniji pad broja trombocita kod majke definiran je s padom broja trombocita ispod 150 000 u mm^3 . Analizom broja trombocita prije i nakon profilakse heparinom ustanovljen je statistički značajan pad broja trombocita s 257 na 215,5 ($P<0,001$) (Tablica 4., Slika 9.). Početno niži broj trombocita (<150) zabilježen je kod

2,49% ispitanica prije uvođenja heparinske profilakse, dok je tijekom profilakse nađen kod 10,61% ispitanica, što označava statistički značajan pad broja trombocita tijekom heparinske profilakse ($P= 0,003$) (Slika 9a.).

7. ZAKLJUČAK

Nasljedna trombofilija predstavlja skupinu mutiranih gena koji svojom aktivnošću mogu utjecati na trudnoću. S obzirom na različitu penetrabilnost i ekspresivnost gena, mutacije će kod određenog broja nositelja uzrokovati patološke promjene i promijeniti kliničku sliku, a drugi pak nositelji neće imati nikakve vidljive promjene tijekom trudnoće. Odluka o probiru, perinatalnoj skrbi i eventualnoj terapiji kod trudnica s mutacijom gena za nasljednu trombofiliju, zahtjeva multidisciplinarni pristup koji može uključivati primarnog ginekologa, hematologa i liječnike u sekundarnim i tercijarnim centrima. Iako su za određene mutacije, kao i za patologiju koju one uzrokuju, stavovi stručnjaka u vezi perinatalne skrbi već poznati, postoje brojne „sive zone“ za koje ne postoji usuglašeno mišljenje stručnjaka. Jedna je od takvih zona i pitanje efektivnosti niskomolekularnog heparina u prevenciji ponovnog spontanog pobačaja kod trudnica s habitualnim pobačajima i nasljednom trombofilijom.

Analizom i uspoređivanjem dobivenih rezultata, a na osnovi prethodno postavljenih ciljeva istraživanja, zaključeno je sljedeće:

1. U ispitivanoj populaciji zdravih trudnica velika je učestalost asimptomatskih nositelja mutacije gena za nasljednu trombofiliju (61,2%).
2. Najučestalija mutacija među ispitanicama koje su bile uključene u studiju u Kliničkom bolničkom centru Zagreb bila je kombinacija mutacije MTHFR i PAI-1 gena (43%). Od ispitivanih mutacija niti jedna ispitanica nije bila FVL homozigot i PGM homozigot. Također, nijedna ispitanica nije imala deficijenciju antitrombina.
3. U skupini ispitanica s habitualnim pobačajima najčešća mutacija bila je kombinacija mutacija MTHFR i PAI-1 gena (43,4%), drugi po učestalosti bili su PAI-1 heterozigoti ili homozigoti (26,7%) a treće mjesto po učestalosti dijelili su MTHFR heterozigoti ili homozigoti (10,7%) i FVL heterozigoti (10,7%).
4. Najveći broj spontanih pobačaja kod ispitanica s nasljednom trombofilijom događao se do trinaestog tjedna, odnosno tijekom prvog tromjesečja trudnoće. Kod profilakse s niskomolekularnim heparinom preporuča se započeti primjenu odmah po ultrazvučno dijagnosticiranim kucajevima čedinjeg srca.
5. Trudnice s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima koje su tijekom trudnoće uzimale profilaksu niskomolekularnim heparinom imale su značajno manji broj ponovnih spontanih pobačaja u odnosu na trudnice koje nisu uzimale niskomolekularni heparin (2,3% u odnosu na 17,1%, $P = 0,001$). Niskomolekularni heparin utječe na uredan ishod trudnoće kod trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima u opstetričkoj anamnezi u smislu prevencije ponovnog spontanog pobačaja.

6. Kod asimptomatskih trudnica s nasljednom trombofilijom i urednom osobnom i opstetričkom anamnezom neopterećenom tromboembolijskim bolestima, primjena niskomolekularnog heparina nije se pokazala neophodnom za uredan ishod trudnoće. Također, kompleksnost mutacija, neovisno o tome radi li se o FVL i PGM ili mutaciji PAI-1 i MTHFR gena, kod asimptomatskih nositelja nije značajnije utjecala na razvoj patologije trudnoće i neonatalni ishod.
7. Potrebna je racionalizacija probira na nasljednu trombofiliju. Probir se preporuča ženama s habitualnim pobačajima posebice onima koje u bliskoj obitelji imaju nositelje „teških“ trombofilija poput FVL, PGM i deficijencije antitrombina ili čiji su članovi obitelji razvili TE prije 50-e godine života. Kod žena reproduktivne dobi neopterećene osobnom i opstetričkom anamnezom, probir je potreban onim ženama koje planiraju trudnoću, a u bliskoj obitelji imaju nositelje „teških“ trombofilija poput FVL, PGM i deficijencije antitrombina.
8. Tijekom profilaktičke primjene heparina zabilježeno je statistički značajno sniženje broja trombocita (uzimajući u obzir referentnu vrijednost od 150 000 u mm³). Potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se potvrdila/opovrgnula direktna povezanost utjecaja heparina na razvoj heparinom inducirane trombocitopenije

8. SAŽETAK

UVOD: Habitualni pobačaji pogađaju 1% žena reproduktivne dobi. U više od 50% slučajeva, etiologija habitualnih pobačaja ostaje nepoznata i samim time pristup pacijenticama s takvom anamnezom predstavlja jedan od najvećih izazova današnje ginekologije i opstetricije. Nasljedna trombofilija kao mogući uzrok spontanih pobačaja tema je velikog broja istraživanja posljednjih dva desetljeća. Osnovni je cilj ove studije ustanoviti opravdanost primjene niskomolekularnog heparina u svrhu poboljšanja perinatalnog ishoda kod trudnica s nasljednom trombofilijom i stanjem nakon dva ili više zadržanih pobačaja. Također, istraživanjem se analizirao perinatalni ishod u skupini asimptomatskih nositelja mutacije gena za nasljednu trombofiliju bez primjene niskomolekularnog heparina.

MATERIJALI I METODE: Prospektivno istraživanje provedeno je na trudnicama Klinike za ženske bolesti i porođaje Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu u razdoblju od 2011. do siječnja 2018. godine. Istraživanje je uključilo tri skupine ispitanica. Prva skupina (NMH+) obuhvaćala je 133 trudnice s dva ili više uzastopnih reteniranih pobačaja i dijagnozom nasljedne trombofilije kojima je u terapiju uključen niskomolekularni heparin u profilaktičnoj dozi, druga je skupina (NMH-) obuhvaćala je 35 trudnica s nasljednom trombofilijom i dva ili više uzastopnih reteniranih pobačaja kojima u profilaksu nije uveden niskomolekularni heparin, a treća skupina (kontrolna) uključila je 55 zdravih trudnica s nasljednom trombofilijom i urednom osobnom i opstetričkom anamnezom (neopterećenom tromboembolijskim bolestima i patologijom prethodnih trudnoća u obliku insuficijencije posteljice) kojima u profilaksu nije uveden niskomolekularni heparin. Definicija nasljedne trombofilije uključila je FVL, mutaciju protrombinskog gena, deficijenciju antitrombina, proteina C, proteina S, mutaciju MTHFR i PAI-1 gena.

U sve tri skupine ispitanica pratio se tijek sadašnje trudnoće, način i tjedan završetka trudnoće i rani neonatalni ishod.

REZULTATI: Trudnice s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima koje su tijekom trudnoće uzimale profilaksu niskomolekularnim heparinom imale su značajno manji broj ponovnih spontanih pobačaja u odnosu na trudnice s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima koje nisu uzimale niskomolekularni heparin ($P= 0,001$). Kod asimptomatskih trudnica s nasljednom trombofilijom i urednom osobnom i opstetričkom anamnezom (neopterećenom TE bolestima i patologijom prethodnih trudnoća u obliku insuficijencije posteljice), primjena niskomolekularnog heparina nije se pokazala neophodnom za uredan ishod trudnoće.

ZAKLJUČAK: Niskomolekularni heparin utječe na uredan ishod trudnoće kod trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima u opstetričkoj anamnezi u smislu prevencije ponovnog spontanog pobačaja. Kod asimptomatskih trudnica s nasljednom

trombofilijom i urednom osobnom i opstetričkom anamnezom, primjena niskomolekularnog heparina nije se pokazala neophodnom za uredan ishod trudnoće.

KLJUČNE RIJEČI: nasljedna trombofilija, habitualni pobačaji, niskomolekularni heparin, perinatalni ishod

9. SUMMARY

ADEQUACY OF LOW- MOLECULAR- WEIGHT HEPARIN PROPHYLAXIS IN PREGNANT WOMEN
WITH HEREDITARY TROMBOPHILIA AS A CAUSE OF RECURRENT PREGNANCY LOSS
(Vesna Sokol Karadjole, 2018)

INTRODUCTION: Approximately 1% of women trying to conceive experience recurrent miscarriage. In 50% of the cases, the etiology of preceding miscarriages remains unknown. For this reason, the appropriate treatment and medical approach to these women are very challenging. Over the last 20 years, many studies have been analyzing the association between inherited thrombophilia and recurrent miscarriages. The main goals of this research were to investigate the perinatal outcome in hereditary thrombophilic patients with recurrent missed abortions after treatment with low molecular weight heparin. Nevertheless, this study evaluates the perinatal outcome in asymptomatic mutation carriers without LMWH prophylaxis.

MATERIALS AND METHODS: The prospective study was conducted at the Department of Gynaecology and Obstetrics, University Hospital Centre Zagreb, from 2011 to January 2018. The research covered three groups of women: the first group (LMWH+) included 133 pregnant women with the history of two or more early recurrent pregnancy loss and hereditary thrombophilia who were treated with a prophylactic dose of LMWH, the second group (LMWH-) enrolled 35 women with habitual abortions and hereditary thrombophilia who were not treated with a prophylactic dose of LMWH and, finally, the third (control) group covered 55 healthy pregnant women (with a negative personal venous thromboembolism and obstetric uteroplacental vascular insufficiency history) with hereditary thrombophilia who were not treated with a prophylactic dose of LMWH. The definition of inherited thrombophilia included the FVL, prothrombin G20210A mutation, antithrombin deficiency, protein C and protein S deficiency, MTHFR mutation and PAI-1 mutation.

RESULTS: Pregnant women with inherited thrombophilia and habitual abortions who were treated with prophylactic doses of LMWH heparin showed a statistically significant reduction in miscarriages compared to women with inherited thrombophilia and two or more previous early pregnancy loss who were not administered the prophylactic dose of LMWH ($P= 0,001$). For a good perinatal outcome, it seems that application of LMWH is not necessary in the group of asymptomatic carriers of mutations with hereditary thrombophilia and negative personal and obstetric history.

CONCLUSION: LMWH has a role in preventing further pregnancy losses in patients with hereditary thrombophilias and recurrent miscarriages. Nevertheless, the current findings

show that LMWH is not required for a good perinatal outcome in asymptomatic carriers of a thrombophilic defect.

Keywords: hereditary thrombophilia, recurrent miscarriages, low molecular weight heparin, perinatal outcome

10. LITERATURA

1. Astrup T. The haemostatic balance. *Thromb Diath Haemorrh* 1958;2(3-4):347-57.
2. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008;359(9):938-49.
3. Watson SP. Collagen receptor signaling in platelets and megakaryocytes. *Thromb Haemost* 1999;82(2):365-76.
4. Dubois C, Panicot-Dubois L, Gainor JF, Furie BC, Furie B. Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *J Clin Invest* 2007;117(4):953-60.
5. Coughlin SR. Protease-activated receptors and platelet function. *Thromb Haemost* 1999;82(2):353-6.
6. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000;407(6801):258-64.
7. Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest* 2003;124(3 Suppl):18S-25S.
8. Leger AJ, Covic L, Kuliopulos A. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation* 2006;114(10):1070-7.
9. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S i sur. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 1998;394(6694):690-4.
10. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V i sur. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001;409(6817):202-7.
11. Clemetson KJ. Platelet GPIb-V-IX complex. *Throm Haemost* 1997;78(1):266-70.
12. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996;84(2):289-97.
13. Bennett JS, Vilaire G. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J Clin Invest* 1979;64(5):1393-401.
14. Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin α IIb β 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1992;267(16):11300-6.
15. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998;91(8):2645-57.
16. Collier BS, Shattil SJ. The GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood* 2008;112(8):3011-25.

17. Kroll MH, Schafer AI. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 1989;74(4):1181-95.
18. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H i sur. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998;98(12):1164-71.
19. Harrison P, Savidge GF, Cramer EM. The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins. *Br J Haematol* 1990;74(2):125-30.
20. Kojima H, Newton-Nash D, Weiss HJ, Zhao J, Sims PJ, Wiedmer T. Production and characterization of transformed B-lymphocytes expressing the membrane defect of Scott syndrome. *J Clin Invest* 1994;94(6):2237-44.
21. Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV. Cellular localization and trafficking of tissue factor. *Blood* 2006;107(12):4746-53.
22. Panes O, Matus V, Saez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood* 2007;109(12):5242-50.
23. Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 2001;86(1):66-74.
24. Konigsberg W, Kirchhofer D, Riederer MA, Nemerson Y. The TF:VIIa complex: clinical significance, structure-function relationships and its role in signaling and metastasis. *Thromb Haemost* 2001;86(3):757-71.
25. Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, Docampo R. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *J Biol Chem* 2004;279(43):44250-7.
26. Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood* 2005;106(8):2605-12.
27. Perry DJ. Antithrombin and its inherited deficiencies. *Blood Rev* 1994;8(1):37-55.
28. Marcum JA, McKenney JB, Rosenberg RD. Acceleration of thrombin-antithrombin complex formation in rat hindquarters via heparinlike molecules bound to the endothelium. *J Clin Invest* 1984;74(2):341-50.
29. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989;264(9):4743-6.
30. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003;124(3 Suppl):26S-32S.
31. Kalafatis M, Bertina RM, Rand MD, Mann KG. Characterization of the molecular defect in factor VR506Q. *J Biol Chem* 1995;270(8):4053-7.
32. Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, Bajaj SP. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2001;86(4):959-72.
33. Baugh RJ, Broze GJ, Jr., Krishnaswamy S. Regulation of extrinsic pathway factor Xa

- formation by tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem* 1998;273(8):4378-86.
34. Jesty J, Wun TC, Lorenz A. Kinetics of the inhibition of factor Xa and the tissue factor-factor VIIa complex by the tissue factor pathway inhibitor in the presence and absence of heparin. *Biochemistry* 1994;33(42):12686-94.
 35. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA, Jr. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(19):10417-22.
 36. Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest* 2006;116(1):4-15.
 37. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329(27):2002-12.
 38. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost* 1980;43(2):77-89.
 39. Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* 1982;257(6):2912-9.
 40. Samis JA, Ramsey GD, Walker JB, Nesheim ME, Giles AR. Proteolytic processing of human coagulation factor IX by plasmin. *Blood* 2000;95(3):943-51.
 41. Stein CM, Brown N, Vaughan DE, Lang CC, Wood AJ. Regulation of local tissue-type plasminogen activator release by endothelium-dependent and endothelium-independent agonists in human vasculature. *J Am Coll Cardiol* 1998;32(1):117-22.
 42. Favier R, Aoki N, de Moerloose P. Congenital alpha(2)-plasmin inhibitor deficiencies: a review. *Br J Haematol* 2001;114(1):4-10.
 43. Colucci M, Binetti BM, Tripodi A, Chantarangkul V, Semeraro N. Hyperprothrombinemia associated with prothrombin G20210A mutation inhibits plasma fibrinolysis through a TAFI-mediated mechanism. *Blood* 2004;103(6):2157-61.
 44. Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y, Krilis SA. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2009;113(5):985-94.
 45. Erkan D, Lockshin MD. What is antiphospholipid syndrome? *Curr Rheumatol Rep* 2004;6(6):451-7.
 46. Vinatier D, Dufour P, Cosson M, Houpeau JL. Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriages. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;96(1):37-50.
 47. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R i sur.

- International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4(2):295-306.
48. Castoldi E, Brugge JM, Nicolaes GA, Girelli D, Tans G, Rosing J. Impaired APC cofactor activity of factor V plays a major role in the APC resistance associated with the factor V Leiden (R506Q) and R2 (H1299R) mutations. *Blood* 2004;103(11):4173-9.
 49. Cramer TJ, Gale AJ. The anticoagulant function of coagulation factor V. *Thromb Haemost* 2012;107(1):15-21.
 50. Zehnder JL, Jain M. Recurrent thrombosis due to compound heterozygosity for factor V Leiden and factor V deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996;7(3):361-2.
 51. Guasch JF, Lensen RP, Bertina RM. Molecular characterization of a type I quantitative factor V deficiency in a thrombosis patient that is "pseudo homozygous" for activated protein C resistance. *Thromb Haemost* 1997;77(2):252-7.
 52. Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306-->Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood* 1998;91(4):1140-4.
 53. Nogami K, Shinozawa K, Ogiwara K, Matsumoto T, Amano K, Fukutake K i sur. Novel FV mutation (W1920R, FVNara) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FVLeiden. *Blood* 2014;123(15):2420-8.
 54. Steen M, Norstrom EA, Tholander AL, Bolton-Maggs PH, Mumford A, McVey JH i sur. Functional characterization of factor V-Ile359Thr: a novel mutation associated with thrombosis. *Blood* 2004;103(9):3381-7.
 55. Mumford AD, McVey JH, Morse CV, Gomez K, Steen M, Norstrom EA i sur. Factor V I359T: a novel mutation associated with thrombosis and resistance to activated protein C. *Br J Haematol* 2003;123(3):496-501.
 56. Pezeshkpoor B, Castoldi E, Mahler A, Hanel D, Muller J, Hamedani NS i sur. Identification and functional characterization of a novel F5 mutation (Ala512Val, FVB onn) associated with activated protein C resistance. *J Thromb Haemost* 2016;14(7):1353-63.
 57. Heijmans BT, Westendorp RG, Knook DL, Kluft C, Slagboom PE. The risk of mortality and the factor V Leiden mutation in a population-based cohort. *Thromb Haemost* 1998;80(4):607-9.
 58. Hille ET, Westendorp RG, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Mortality and causes of death in families with the factor V Leiden mutation (resistance to activated protein C). *Blood* 1997;89(6):1963-7.
 59. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma

- prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88(10):3698-703.
60. Girolami A, Scarano L, Tormene D, Cella G. Homozygous patients with the 20210 G to A prothrombin polymorphism remain often asymptomatic in spite of the presence of associated risk factors. *Clin Appl Thromb Hemost* 2001;7(2):122-5.
 61. Mannucci PM, Franchini M. Classic thrombophilic gene variants. *Thromb Haemost* 2015;114(5):885-9.
 62. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Tirado I, Borell M, Mateo J i sur. Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood* 2000;95(9):2780-5.
 63. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS i sur. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998;79(4):706-8.
 64. Zivelin A, Rosenberg N, Faier S, Kornbrot N, Peretz H, Mannhalter C i sur. A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood* 1998;92(4):1119-24.
 65. Margaglione M, Brancaccio V, Giuliani N, D'Andrea G, Cappucci G, Iannaccone L i sur. Increased risk for venous thrombosis in carriers of the prothrombin G-->A20210 gene variant. *Ann Intern Med* 1998;129(2):89-93.
 66. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T i sur. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;86(3):809-16.
 67. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Cappucci G, Brancaccio V i sur. Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: roles of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179(5):1324-8.
 68. Clouse LH, Comp PC. The regulation of hemostasis: the protein C system. *N Engl J Med* 1986;314(20):1298-304.
 69. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007;109(8):3161-72.
 70. Polack B, Pouzol P, Amiral J, Kolodie L. Protein C level at birth. *Thromb Haemost* 1984;52(2):188-91.
 71. Miletich J, Sherman L, Broze G, Jr. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987;317(16):991-6.
 72. Foster DC, Yoshitake S, Davie EW. The nucleotide sequence of the gene for human

- protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(14):4673-7.
73. Plutzky J, Hoskins JA, Long GL, Crabtree GR. Evolution and organization of the human protein C gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(3):546-50.
 74. Mannucci PM, Vigano S. Deficiencies of protein C, an inhibitor of blood coagulation. *Lancet* 1982;2(8296):463-7.
 75. Griffin JH, Mosher DF, Zimmerman TS, Kleiss AJ. Protein C, an antithrombotic protein, is reduced in hospitalized patients with intravascular coagulation. *Blood* 1982;60(1):261-4.
 76. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR i sur. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995;73(1):87-93.
 77. Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism--results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost* 1997;77(3):444-51.
 78. Gladson CL, Scharrer I, Hach V, Beck KH, Griffin JH. The frequency of type I heterozygous protein S and protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1988;59(1):18-22.
 79. Heijboer H, Brandjes DP, Buller HR, Sturk A, ten Cate JW. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1990;323(22):1512-6.
 80. Teepe RG, Broekmans AW, Vermeer BJ, Nienhuis AM, Loeliger EA. Recurrent coumarin-induced skin necrosis in a patient with an acquired functional protein C deficiency. *Arch Dermatol* 1986;122(12):1408-12.
 81. Sallah S, Abdallah JM, Gagnon GA. Recurrent warfarin-induced skin necrosis in kindreds with protein S deficiency. *Haemostasis* 1998;28(1):25-30.
 82. Makris M, Bardhan G, Preston FE. Warfarin induced skin necrosis associated with activated protein C resistance. *Thromb Haemost* 1996;75(3):523-4.
 83. Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, Briet E, Berntorp E, Conard J i sur. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 1996;348(9032):913-6.
 84. Bovill EG, Bauer KA, Dickerman JD, Callas P, West B. The clinical spectrum of heterozygous protein C deficiency in a large New England kindred. *Blood* 1989;73(3):712-7.
 85. Pabinger I, Allaart CF, Hermans J, Briet E, Bertina RM. Hereditary protein C-deficiency: laboratory values in transmitters and guidelines for the diagnostic procedure. Report on a study of the SSC Subcommittee on Protein C and Protein S. Protein C Transmitter Study Group. *Thromb Haemost* 1992;68(4):470-4.
 86. Esmon CT. Protein S and protein C Biochemistry, physiology, and clinical

- manifestation of deficiencies. *Trends Cardiovasc Med* 1992;2(6):214-9.
87. Koppelman SJ, Hackeng TM, Sixma JJ, Bouma BN. Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. *Blood* 1995;86(3):1062-71.
 88. Hackeng TM, van 't Veer C, Meijers JC, Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *J Biol Chem* 1994;269(33):21051-8.
 89. Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, Soeda T, Nishiya K, Ogiwara K, et al. Protein S down-regulates factor Xase activity independent of activated protein C: specific binding of factor VIII(a) to protein S inhibits interactions with factor IXa. *Br J Haematol* 2008;143(3):409-20.
 90. Dahlback B. C4b-binding protein: a forgotten factor in thrombosis and hemostasis. *Semin Thromb Hemost* 2011;37(4):355-61.
 91. Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood* 2004;103(4):1192-201.
 92. Fair DS, Revak DJ. Quantitation of human protein S in the plasma of normal and warfarin-treated individuals by radioimmunoassay. *Thromb Res* 1984;36(6):527-35.
 93. Ploos van Amstel JK, van der Zanden AL, Bakker E, Reitsma PH, Bertina RM. Two genes homologous with human protein S cDNA are located on chromosome 3. *Thromb Haemost* 1987;58(4):982-7.
 94. Schmidel DK, Tatro AV, Phelps LG, Tomczak JA, Long GL. Organization of the human protein S genes. *Biochemistry* 1990;29(34):7845-52.
 95. Gandrille S, Borgel D, Sala N, Espinosa-Parrilla Y, Simmonds R, Rezende S i sur. Protein S deficiency: a database of mutations--summary of the first update. *Thromb Haemost* 2000;84(5):918.
 96. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984;64(6):1297-300.
 97. Broekmans AW, Bertina RM, Reinalda-Poot J, Engesser L, Muller HP, Leeuw JA i sur. Hereditary protein S deficiency and venous thrombo-embolism. A study in three Dutch families. *Thromb Haemost* 1985;53(2):273-7.
 98. Pintao MC, Ribeiro DD, Bezemer ID, Garcia AA, de Visser MC, Doggen CJ i sur. Protein S levels and the risk of venous thrombosis: results from the MEGA case-control study. *Blood* 2013;122(18):3210-9.
 99. Klostermeier UC, Limperger V, Kenet G, Kurnik K, Alhenc Gelas M, Finckh U i sur. Role of protein S deficiency in children with venous thromboembolism. An observational international cohort study. *Thromb Haemost* 2015;113(2):426-33.

100. Simmonds RE, Ireland H, Lane DA, Zoller B, Garcia de Frutos P, Dahlback B. Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect. *Ann Intern Med* 1998;128(1):8-14.
101. Smock KJ, Plumhoff EA, Meijer P, Hsu P, Zantek ND, Heikal NM i sur. Protein S testing in patients with protein S deficiency, factor V Leiden, and rivaroxaban by North American Specialized Coagulation Laboratories. *Thromb Haemost* 2016;116(1):50-7.
102. Lijfering WM, Mulder R, ten Kate MK, Veeger NJ, Mulder AB, van der Meer J. Clinical relevance of decreased free protein S levels: results from a retrospective family cohort study involving 1143 relatives. *Blood* 2009;113(6):1225-30.
103. Khor B, Van Cott EM. Laboratory tests for antithrombin deficiency. *Am J Hematol* 2010;85(12):947-50.
104. Dahlback B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008;112(1):19-27.
105. Zhou A, Huntington JA, Carrell RW. Formation of the antithrombin heterodimer in vivo and the onset of thrombosis. *Blood* 1999;94(10):3388-96.
106. McDonald MM, Hathaway WE, Reeve EB, Leonard BD. Biochemical and functional study of antithrombin III in newborn infants. *Thromb Haemost* 1982;47(1):56-8.
107. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM i sur. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987;70(1):165-72.
108. Kumar R, Chan AK, Dawson JE, Forman-Kay JD, Kahr WH, Williams S. Clinical presentation and molecular basis of congenital antithrombin deficiency in children: a cohort study. *Br J Haematol* 2014;166(1):130-9.
109. Wells PS, Blajchman MA, Henderson P, Wells MJ, Demers C, Bourque R i sur. Prevalence of antithrombin deficiency in healthy blood donors: a cross-sectional study. *Am J Hematol* 1994;45(4):321-4.
110. Remak G, Hottenstein OD, Jacobson ED. Multifactorial mediation of post norepinephrine induced intestinal hyperemia. *J Physiol Pharmacol* 1994;45(2):241-57.
111. Meillon-Garcia LA, Hernandez-Zamora E, Montiel-Manzano G, Zavala-Hernandez C, Ramirez-San Juan E, Cesarman-Maus G i sur. Anticoagulant proteins in a population of Mexican mestizo donors. *Ann Vasc Surg* 2015;29(2):222-6.
112. Candrina R, Goppini A, Salvi A, Zuccato F, Giustina G. Arterial thrombosis in antithrombin III deficiency. *Clin Lab Haematol* 1986;8(3):267-8.
113. Di Minno MN, Ambrosino P, Ageno W, Rosendaal F, Di Minno G, Dentali F. Natural anticoagulants deficiency and the risk of venous thromboembolism: a meta-analysis

- of observational studies. *Thromb Res* 2015;135(5):923-32.
114. Rheaume M, Weber F, Durand M, Mahone M. Pregnancy-Related Venous Thromboembolism Risk in Asymptomatic Women With Antithrombin Deficiency: A Systematic Review. *Obstet Gynecol* 2016;127(4):649-56.
 115. Conard J, Horellou MH, Van Dreden P, Lecompte T, Samama M. Thrombosis and pregnancy in congenital deficiencies in AT III, protein C or protein S: study of 78 women. *Thromb Haemost* 1990;63(2):319-20.
 116. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989;114(5):473-501.
 117. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* 1996;2(4):386-9.
 118. Smith SC, Jr., Milani RV, Arnett DK, Crouse JR, 3rd, McDermott MM, Ridker PM i sur. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group II: risk factors. *Circulation* 2004;109(21):2613-6.
 119. McColl MD, Ellison J, Reid F, Tait RC, Walker ID, Greer IA. Prothrombin 20210 G-->A, MTHFR C677T mutations in women with venous thromboembolism associated with pregnancy. *BJOG* 2000;107(4):565-9.
 120. Haemostasis, Thrombosis Task Force BCfSiH. Investigation and management of heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2001;114(3):512-28.
 121. Greer IA. The challenge of thrombophilia in maternal-fetal medicine. *N Engl J Med* 2000;342(6):424-5.
 122. Domagala TB, Adamek L, Nizankowska E, Sanak M, Szczeklik A. Mutations C677T and A1298C of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene and fasting plasma homocysteine levels are not associated with the increased risk of venous thromboembolic disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13(5):423-31.
 123. Zotz RB, Gerhardt A, Scharf RE. Inherited thrombophilia and gestational venous thromboembolism. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;16(2):243-59.
 124. Dizon-Townson D, Miller C, Sibai B, Spong CY, Thom E, Wendel G, Jr. i sur. The relationship of the factor V Leiden mutation and pregnancy outcomes for mother and fetus. *Obstet Gynecol* 2005;106(3):517-24.
 125. Said JM, Higgins JR, Moses EK, Walker SP, Borg AJ, Monagle PT i sur. Inherited thrombophilia polymorphisms and pregnancy outcomes in nulliparous women. *Obstet Gynecol* 2010;115(1):5-13.
 126. Lindqvist PG, Svensson PJ, Marsaal K, Grennert L, Luterkort M, Dahlback B. Activated protein C resistance (FV:Q506) and pregnancy. *Thromb Haemost* 1999;81(4):532-7.
 127. Silver RM, Zhao Y, Spong CY, Sibai B, Wendel G, Jr., Wenstrom K i sur. Prothrombin

- gene G20210A mutation and obstetric complications. *Obstet Gynecol* 2010;115(1):14-20.
128. Kjellberg U, van Rooijen M, Bremme K, Hellgren M. Factor V Leiden mutation and pregnancy-related complications. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203(5):469 e1-8.
 129. Grandone E, Colaizzo D, Lo Bue A, Checchia MG, Cittadini E, Margaglione M. Inherited thrombophilia and in vitro fertilization implantation failure. *Fertil Steril* 2001;76(1):201-2.
 130. Qublan H, Amarin Z, Dabbas M, Farraj AE, Beni-Merei Z, Al-Akash H i sur. Low-molecular-weight heparin in the treatment of recurrent IVF-ET failure and thrombophilia: a prospective randomized placebo-controlled trial. *Hum Fertil (Camb)* 2008;11(4):246-53.
 131. Kaandorp SP, van Mens TE, Middeldorp S, Hutten BA, Hof MH, van der Post JA i sur. Time to conception and time to live birth in women with unexplained recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2014;29(6):1146-52.
 132. Steinvil A, Raz R, Berliner S, Steinberg DM, Zeltser D, Levrant D i sur. Association of common thrombophilias and antiphospholipid antibodies with success rate of in vitro fertilisation. *Thromb Haemost* 2012;108(6):1192-7.
 133. Clark P, Walker ID, Govan L, Wu O, Greer IA. The GOAL study: a prospective examination of the impact of factor V Leiden and ABO(H) blood groups on haemorrhagic and thrombotic pregnancy outcomes. *Br J Haematol* 2008;140(2):236-40.
 134. de Vries JI, Dekker GA, Huijgens PC, Jakobs C, Blomberg BM, van Geijn HP. Hyperhomocysteinaemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. *Obstet Gynaecol* 1997;104(11):1248-54.
 135. Brenner B. Thrombophilia and fetal loss. *Semin Thromb Hemost* 2003;29(2):165-70.
 136. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003;361(9361):901-8.
 137. Sottolotta G, Oriana V, Latella C, Luise F, Piromalli A, Ramirez F i sur. Genetic prothrombotic risk factors in women with unexplained pregnancy loss. *Thromb Res* 2006;117(6):681-4.
 138. Kocher O, Cirovic C, Malynn E, Rowland CM, Bare LA, Young BA i sur. Obstetric complications in patients with hereditary thrombophilia identified using the LCx microparticle enzyme immunoassay: a controlled study of 5,000 patients. *Am J Clin Pathol* 2007;127(1):68-75.
 139. Murphy RP, Donoghue C, Nallen RJ, D'Mello M, Regan C, Whitehead AS i sur. Prospective evaluation of the risk conferred by factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in pregnancy. *Arterioscler*

- Thromb Vasc Biol 2000;20(1):266-70.
140. Alfirevic Z, Roberts D, Martlew V. How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;101(1):6-14.
 141. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD i sur. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol* 2006;132(2):171-96.
 142. Kosmas IP, Tatsioni A, Ioannidis JP. Association of Leiden mutation in factor V gene with hypertension in pregnancy and pre-eclampsia: a meta-analysis. *J Hypertens* 2003;21(7):1221-8.
 143. Dudding TE, Attia J. The association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V Leiden genotype: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 2004;91(4):700-11.
 144. Lin J, August P. Genetic thrombophilias and preeclampsia: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2005;105(1):182-92.
 145. Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertil Steril* 2003;79(3):577-84.
 146. Lohstroh PN, Overstreet JW, Stewart DR, Nakajima ST, Cragun JR, Boyers SP i sur. Secretion and excretion of human chorionic gonadotropin during early pregnancy. *Fertil Steril* 2005;83(4):1000-11.
 147. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 2000;320(7251):1708-12.
 148. Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ* 1989;299(6698):541-5.
 149. Ness RB, Grisso JA, Hirschinger N, Markovic N, Shaw LM, Day NL i sur. Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med* 1999;340(5):333-9.
 150. Armstrong BG, McDonald AD, Sloan M. Cigarette, alcohol, and coffee consumption and spontaneous abortion. *Am J Public Health* 1992;82(1):85-7.
 151. Windham GC, Von Behren J, Fenster L, Schaefer C, Swan SH. Moderate maternal alcohol consumption and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology* 1997;8(5):509-14.
 152. Phillips CA, Poyser NL. Studies on the involvement of prostaglandins in implantation in the rat. *J Reprod Fertil* 1981;62(1):73-81.
 153. Li DK, Liu L, Odouli R. Exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and risk of miscarriage: population based cohort study. *BMJ* 2003;327(7411):368.
 154. George L, Mills JL, Johansson AL, Nordmark A, Olander B, Granath F i sur. Plasma

- folate levels and risk of spontaneous abortion. *JAMA* 2002;288(15):1867-73.
155. van der Eijk AA, van Genderen PJ, Verdijk RM, Reusken CB, Mogling R, van Kampen JJ i sur. Miscarriage Associated with Zika Virus Infection. *N Engl J Med* 2016;375(10):1002-4.
 156. Practice Committee of American Society for Reproductive M. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013;99(1):63.
 157. Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2006;21(9):2216-22.
 158. Kolte AM, van Oppenraaij RH, Quenby S, Farquharson RG, Stephenson M, Goddijn M i sur. Non-visualized pregnancy losses are prognostically important for unexplained recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2014;29(5):931-7.
 159. Kolte AM, Bernardi LA, Christiansen OB, Quenby S, Farquharson RG, Goddijn M i sur. Terminology for pregnancy loss prior to viability: a consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. *Hum Reprod* 2015;30(3):495-8.
 160. Salat-Baroux J. [Recurrent spontaneous abortions]. *Reprod Nutr Dev* 1988;28(6B):1555-68.
 161. Hatasaka HH. Recurrent miscarriage: epidemiologic factors, definitions, and incidence. *Clin Obstet Gynecol* 1994;37(3):625-34.
 162. Scott JR, Rote NS, Branch DW. Immunologic aspects of recurrent abortion and fetal death. *Obstet Gynecol* 1987;70(4):645-56.
 163. van der Ven K, Skrabin S, Ober C, Krebs D. HLA-G polymorphisms: ethnic differences and implications for potential molecule function. *Am J Reprod Immunol* 1998;40(3):145-57.
 164. Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PM, Knecht AC, Gerssen-Schoorl KB i sur. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 2005;331(7509):137-41.
 165. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* 1990;5(5):519-28.
 166. Roque H, Paidas MJ, Funai EF, Kuczyński E, Lockwood CJ. Maternal thrombophilias are not associated with early pregnancy loss. *Thromb Haemost* 2004;91(2):290-5.
 167. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 1992;80(2):283-5.
 168. Jaffe R. Investigation of abnormal first-trimester gestations by color Doppler imaging. *J Clin Ultrasound* 1993;21(8):521-6.
 169. Tiscia G, Colaizzo D, Chinni E, Pisanelli D, Sciannone N, Favuzzi G i sur. Haplotype M2 in the annexin A5 (ANXA5) gene and the occurrence of obstetric complications.

- Thromb Haemost 2009;102(2):309-13.
170. Bogdanova N, Horst J, Chlystun M, Croucher PJ, Nebel A, Bohring A i sur. A common haplotype of the annexin A5 (ANXA5) gene promoter is associated with recurrent pregnancy loss. *Hum Mol Genet* 2007;16(5):573-8.
 171. Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inagaki A, Egusa H i sur. Polymorphisms in the annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 2011;17(7):447-52.
 172. Rogenhofer N, Engels L, Bogdanova N, Tuttelmann F, Markoff A, Thaler C. Paternal and maternal carriage of the annexin A5 M2 haplotype are equal risk factors for recurrent pregnancy loss: a pilot study. *Fertil Steril* 2012;98(2):383-8.
 173. Karata S, Aydin Y, Ocer F, Buyru A, Balci H. Hereditary thrombophilia, anti-beta2 glycoprotein 1 IgM, and anti-annexin V antibodies in recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2012;67(3):251-5.
 174. Empson M, Lassere M, Craig J, Scott J. Prevention of recurrent miscarriage for women with antiphospholipid antibody or lupus anticoagulant. *Cochrane Database Syst Rev* 2005(2):CD002859.
 175. Visser J, Ulander VM, Helmerhorst FM, Lampinen K, Morin-Papunen L, Bloemenkamp KW i sur. Thromboprophylaxis for recurrent miscarriage in women with or without thrombophilia. HABENOX: a randomised multicentre trial. *Thromb Haemost* 2011;105(2):295-301.
 176. Bates SM, Greer IA, Middeldorp S, Veenstra DL, Prabulos AM, Vandvik PO. VTE, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141(2 Suppl):e691S-e736S.
 177. Fatma N, Singh DP, Shinohara T, Chylack LT, Jr. Heparin's roles in stabilizing, potentiating, and transporting LEDGF into the nucleus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(9):2648-57.
 178. Wijelath E, Namekata M, Murray J, Furuyashiki M, Zhang S, Coan D i sur. Multiple mechanisms for exogenous heparin modulation of vascular endothelial growth factor activity. *J Cell Biochem* 2010;111(2):461-8.
 179. Mousa HA, Alfievic Z. Do placental lesions reflect thrombophilia state in women with adverse pregnancy outcome? *Hum Reprod* 2000;15(8):1830-3.
 180. Meinardi JR, Middeldorp S, de Kam PJ, Koopman MM, van Pampus EC, Hamulyak K, i sur. Increased risk for fetal loss in carriers of the factor V Leiden mutation. *Ann Intern Med* 1999;130(9):736-9.
 181. Parand A, Zolghadri J, Nezam M, Afrasiabi A, Haghpahan S, Karimi M. Inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss. *Iran Red Crescent Med J*

- 2013;15(12):e13708.
182. Younis JS, Brenner B, Ohel G, Tal J, Lanir N, Ben-Ami M. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation can be associated with first-as well as second-trimester recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2000;43(1):31-5.
 183. Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rubsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U i sur. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol* 2001;46(2):124-31.
 184. Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal A. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2002;17(6):1633-7.
 185. Martinelli I. Pros and cons of thrombophilia testing: pros. *J Thromb Haemost* 2003;1(3):410-1.
 186. Wu O, Robertson L, Twaddle S, Lowe GD, Clark P, Greaves M i sur. Screening for thrombophilia in high-risk situations: systematic review and cost-effectiveness analysis. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) study. *Health Technol Assess* 2006;10(11):1-110.
 187. Mazzucconi MG, De Sanctis V, Alfo M, Amendolea MA, Conti L, Santoro C i sur. Maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome: a case-control study. *Acta Haematol.* 2015;133(2):242-8.
 188. Hustin J, Schaaps JP. Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157(1):162-8.
 189. Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Nutrition of the human fetus during the first trimester--a review. *Placenta* 2001;22 Suppl A:S70-7.
 190. Brenner B, Hoffman R, Blumenfeld Z, Weiner Z, Younis JS. Gestational outcome in thrombophilic women with recurrent pregnancy loss treated by enoxaparin. *Thromb Haemost* 2000;83(5):693-7.
 191. Carp H, Dolitzky M, Inbal A. Thromboprophylaxis improves the live birth rate in women with consecutive recurrent miscarriages and hereditary thrombophilia. *J Thromb Haemost* 2003;1(3):433-8.
 192. Rodger MA, Betancourt MT, Clark P, Lindqvist PG, Dizon-Townson D, Said J i sur. The association of factor V leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated pregnancy complications: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *PLoS Med* 2010;7(6):e1000292.
 193. Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A i sur. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl*

- J Med 1999;340(1):9-13.
194. Middeldorp S. Thrombophilia and pregnancy complications: cause or association? *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1:276-82.
 195. Abheiden C, Van Hoorn ME, Hague WM, Kostense PJ, van Pampus MG, de Vries J. Does low-molecular-weight heparin influence fetal growth or uterine and umbilical arterial Doppler in women with a history of early-onset uteroplacental insufficiency and an inheritable thrombophilia? Secondary randomised controlled trial results. *BJOG* 2016;123(5):797-805.
 196. Rodger MA, Hague WM, Kingdom J, Kahn SR, Karovitch A, Sermer M i sur. Antepartum dalteparin versus no antepartum dalteparin for the prevention of pregnancy complications in pregnant women with thrombophilia (TIPPS): a multinational open-label randomised trial. *Lancet* 2014;384(9955):1673-83.
 197. Gris JC, Mercier E, Quere I, Lavigne-Lissalde G, Cochery-Nouvellon E, Hoffet M i sur. Low-molecular-weight heparin versus low-dose aspirin in women with one fetal loss and a constitutional thrombophilic disorder. *Blood* 2004;103(10):3695-9.
 198. Rodger MA, Langlois NJ, de Vries JI, Rey E, Gris JC, Martinelli I i sur. Low-molecular-weight heparin for prevention of placenta-mediated pregnancy complications: protocol for a systematic review and individual patient data meta-analysis (AFFIRM). *Syst Rev* 2014;3:69.
 199. Deligiannidis A, Parapanissiou E, Mavridis P, Tabakoudis G, Mavroudi A, Papastavrou T i sur. Thrombophilia and antithrombotic therapy in women with recurrent spontaneous abortions. *J Reprod Med* 2007;52(6):499-502.
 200. Brenner B, Hoffman R, Carp H, Dulitsky M, Younis J, Investigators L-E. Efficacy and safety of two doses of enoxaparin in women with thrombophilia and recurrent pregnancy loss: the LIVE-ENOX study. *J Thromb Haemost* 2005;3(2):227-9.
 201. de Jong PG, Quenby S, Bloemenkamp KW, Braams-Lisman BA, de Bruin JP, Coomarasamy A i sur. ALIFE2 study: low-molecular-weight heparin for women with recurrent miscarriage and inherited thrombophilia--study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015;16:208.
 202. Clark P, Walker ID, Langhorne P, Crichton L, Thomson A, Greaves M i sur. SPIN (Scottish Pregnancy Intervention) study: a multicenter, randomized controlled trial of low-molecular-weight heparin and low-dose aspirin in women with recurrent miscarriage. *Blood* 2010;115(21):4162-7.
 203. Schleussner E, Kamin G, Seliger G, Rogenhofer N, Ebner S, Toth B i sur. Low-molecular-weight heparin for women with unexplained recurrent pregnancy loss: a multicenter trial with a minimization randomization scheme. *Ann Intern Med* 2015;162(9):601-9.

204. Kaandorp SP, Goddijn M, van der Post JA, Hutten BA, Verhoeve HR, Hamulyak K i sur. Aspirin plus heparin or aspirin alone in women with recurrent miscarriage. *N Engl J Med* 2010;362(17):1586-96.
205. Skeith L, Carrier M, Kaaja R, Martinelli I, Petroff D, Schleussner E i sur. A meta-analysis of low-molecular-weight heparin to prevent pregnancy loss in women with inherited thrombophilia. *Blood* 2016;127(13):1650-5.
206. de Jong PG, Kaandorp S, Di Nisio M, Goddijn M, Middeldorp S. Aspirin and/or heparin for women with unexplained recurrent miscarriage with or without inherited thrombophilia. *Cochrane Database Syst Rev* 2014(7):CD004734.
207. Manduteanu I, Voinea M, Capraru M, Dragomir E, Simionescu M. A novel attribute of enoxaparin: inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells by a mechanism involving cell adhesion molecules. *Pharmacology* 2002;65(1):32-7.
208. Di Simone N, Ferrazzani S, Castellani R, De Carolis S, Mancuso S, Caruso A. Heparin and low-dose aspirin restore placental human chorionic gonadotrophin secretion abolished by antiphospholipid antibody-containing sera. *Hum Reprod* 1997;12(9):2061-5.
209. Fiedler K, Wurfel W. Effectivity of heparin in assisted reproduction. *Eur J Med Res* 2004;9(4):207-14.
210. Girardi G, Redecha P, Salmon JE. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med* 2004;10(11):1222-6.
211. Bates SM, Greer IA, Hirsh J, Ginsberg JS. Use of antithrombotic agents during pregnancy: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126(3 Suppl):627S-44S.
212. Monreal M. Long-term treatment of venous thromboembolism with low-molecular-weight heparin. *Curr Opin Pulm Med* 2000;6(4):326-9.
213. Greer IA, Nelson-Piercy C. Low-molecular-weight heparins for thromboprophylaxis and treatment of venous thromboembolism in pregnancy: a systematic review of safety and efficacy. *Blood* 2005;106(2):401-7.
214. Dolitzky M, Inbal A, Segal Y, Weiss A, Brenner B, Carp H. A randomized study of thromboprophylaxis in women with unexplained consecutive recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2006;86(2):362-6.
215. Badawy AM, Khiary M, Sherif LS, Hassan M, Ragab A, Abdelall I. Low-molecular weight heparin in patients with recurrent early miscarriages of unknown aetiology. *J Obstet Gynaecol* 2008;28(3):280-4.
216. American College of Obstetricians and Gynecologists Women's Health Care Physicians. ACOG Practice Bulletin No. 138: Inherited thrombophilias in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013; 122:706. Reaffirmed 2017

217. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Green-top Guideline No 17. The Investigation and Treatment Of Couples with Recurrent First trimester and Second-trimester Miscarriage. RCOG. 2011
218. ASRM. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion, Fertil Steril 2013;99:63

10.1. POPIS SLIKOVNOG MATERIJALA

Slika 1. Vanjski i unutarnji mehanizam zgrušavanja krvi

Slika 2. Leung LLK, *Overview of hemostasis*; 2018.

https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=HEME%2F111299&topicKey=HEME%2F1371&search=hemostasis&rank=1~150&source=see_link (03.09.2018.)

Slika 3. Bunn HF, Bauer KA. *Thrombotic Disorders; Pathophysiology of Blood Disorders*, Bunn HF, Aster JC (Eds), McGraw-Hill Education, New York 2011.

https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=HEME%2F110320&topicKey=HEME%2F1371&search=haemostasis&rank=1~150&source=see_link (03.09.2018.)

Slika 4. Leung LLK, *Overview of hemostasis*, 2018.

https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=HEME%2F81428&topicKey=HEME%2F1371&search=hemostasis&rank=1~150&source=see_link (03.09.2018.)

Slika 5. Bauer KA, *Prothrombin G20210A mutation*, 2018.

https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=HEME%2F110925&topicKey=HEME%2F1359&search=prothrombin%20gene%20mutation&rank=1~108&source=see_link (03.09.2018.)

Slika 6. Dražančić A, *Centilne vrijednosti težine novorođenčadi po rodosti majke i spolu djeteta u Zagrebu 1982. godine, Porodništvo*; 1994.

Slika 7. Real-time TaqMan PCR tehnologija
(www.gibthai.com) (12.05.2018.)

Slika 8. Raspodjela ispitanica u kohortne skupine

Slika 9. Razlike u broju trombocita kod praćenih ispitanica prije i tijekom NMH profilakse

Slika 9a. Promjena broja trombocita prije i tijekom NMH profilakse

Slika 10. Vrste mutacija za nasljednu trombofiliju u ispitivanim grupama

Slika 11. Pobačaj kao ishod aktualne trudnoće u NMH+ i NMH- skupini ispitanica

Slika 12. Rani neonatalni ishod u tri skupine ispitanica, NMH+, NMH- i kontrolna skupina

Slika 13. Utjecaj heparina na ishod trudnoće kod trudnica s nasljednom trombofilijom i habitualnim pobačajima

Slika 14. Utjecaj heparina na ishod trudnoće kod trudnica s habitualnim pobačajima i „*blagim*“ mutacijama za nasljednu trombofiliju

Slika 15. Ishod trudnoće kod ispitanica NMH- skupine u odnosu na kontrolnu skupinu

Slika 16. Utjecaj heparinske profilakse na ishod trudnoće u trudnica s nasljednom trombofilijom i prethodnim habitualnim pobačajima; meta analiza

Slika 17. Leung LLK, *Overview of hemostasis*; 2018.

https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=HEME%2F101832&topicKey=HEME%2F1371&search=hemostasis&rank=1~150&source=see_link

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 27.06.1983. godine u Makarskoj. Osnovnoškolsko i srednješkolsko obrazovanje stekla sam u Zagrebu (II gimnazija). Na Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam se 2001. godine te diplomirala 2007. godine. Pripravnički staž sam obavila u Kliničkoj bolnici Dubrava, Zagreb te 2008. godine položila stručni ispit za doktora medicine i stekla licencu za samostalan rad. U periodu od 2009. do 2010. godine voditelj sam tima Obiteljske medicine u primarnoj zdravstvenoj zaštiti, Dom Zdravlja Zagreb- Istok. Specijalizaciju iz ginekologije i opstetricije započela sam 2010. godine pod mentorstvom prof.dr.sc. Dubravka Barišića. Znanstveni poslijediplomski doktorski studij u području biomedicine i zdravstva na Medicinskom fakultetu u Zagrebu upisujem 2011. godine te započinjem izradu disertacije pod mentorstvom prof.dr.sc. Marine Ivanišević. Dio specijalizacije 2014. godine odrađujem u Liverpool Women's Hospital na Odjelu Fetal Medicine pod mentorstvom prof.dr.sc. Žarka Alfirevića. Specijalistički ispit sam položila 2015. godine i od tada radim na Zavodu za perinatalnu medicinu, Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb. Autor sam i koautor nekoliko radova objavljenih u indeksiranim publikacijama te aktivno sudjelujem na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima.